

**Identifikation und Charakterisierung von Protein-  
Interaktionspartnern des Transkriptionsfaktors  
CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\beta$**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

**Dipl.-Biol. Ole Pleß**

geboren am 15.12.1976 in Hamburg

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Achim Leutz  
2. Prof. Dr. Klaus Scheiderei  
3. Prof. Dr. Thomas Sommer

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2007

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>7</b>
<b>Widmung</b>	<b>8</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>9</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Struktur und Funktion des CCAAT/Enhancer Binding Proteins <math>\beta</math></b>	<b>11</b>
1.1.1 Die C/EBP $\beta$ basic leucine zipper Domäne	12
1.1.2 Die C/EBP $\beta$ transaktivierende Domäne	13
1.1.3 Die C/EBP $\beta$ regulatorische Domäne	14
<b>1.2 Modifikation durch „Small Ubiquitin-like Modifiers“ (SUMO)</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Funktionelle Veränderungen von Transkriptionsfaktoren durch SUMO-Konjugation</b>	<b>17</b>
1.3.1 Repression durch SUMO-Konjugation	17
1.3.2 Aktivierung durch SUMO-Konjugation	18
1.3.3 Änderung der subnukleären Lokalisation durch SUMO	18
1.3.4 Änderung der Proteinstabilität durch SUMO	18
1.3.5 Änderung der Proteinkonformation durch SUMO	19
<b>1.4 SUMOylierung führt zur Modulation von Protein-Protein-Interaktionen</b>	<b>19</b>
<b>1.5 SUMOylierung ist essentiell für die Organisation und Funktion des Zellkerns</b>	<b>19</b>
<b>1.6 Protein inhibitor of activated STAT (PIAS)</b>	<b>20</b>
<b>1.7 Posttranslationale Modifikationen von C/EBP<math>\beta</math></b>	<b>22</b>
<b>1.8 Ziele der Arbeit</b>	<b>24</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>25</b>
2.1.1 Chemikalien	25
2.1.2 Kits	27
2.1.3 Enzyme	27
2.1.4 Proteine	28
2.1.5 Antikörper	28
2.1.6 Chromatographie	29
2.1.7 Bakterien	29
2.1.8 Zellkultur	30

2.1.9	Zelllinien	30
2.1.10	Laborgeräte	31
2.1.11	Oligonukleotidsequenzen und Vektoren	31
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>35</b>
2.2.1	DNA Methoden	35
2.2.1.1	Amplifikation von Plasmid-DNA	35
2.2.1.2	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	35
2.2.1.3	Präparation von Plasmid-DNA	35
2.2.1.4	Molekulare Klonierungen	35
2.2.1.5	PCR	36
2.2.1.6	Mutagenese	36
2.2.1.7	DNA Sequenzierung	36
2.2.2	RNA Methoden	36
2.2.2.1	Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen	36
2.2.2.2	polyA-Selektion von mRNA	36
2.2.2.3	Elektrophorese von RNA und Northern-Hybridisierung	37
2.2.3	Biochemische Methoden	37
2.2.3.1	Eindimensionale SDS-Gelelektrophorese von Proteinen	37
2.2.3.2	Coomassie-Färbung von SDS-Proteingelen	37
2.2.3.3	Silberfärbung von SDS-Proteingelen (für die Massenspektrometrie)	38
2.2.3.4	Immunoblot und Immunodetektion	38
2.2.3.5	Koimmunopräzipitation	39
2.2.3.6	Expression von Proteinen in <i>Escherichia coli</i>	39
2.2.3.7	Expression SUMOylierter Proteine in <i>E. coli</i>	40
2.2.3.8	Affinitätsreinigung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen	40
2.2.3.9	Enzymatische Spaltung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen mittels Thrombin Protease	41
2.2.3.10	Affinitätsreinigung von His-Fusionsproteinen	41
2.2.3.11	Dialyse von Proteinlösungen	42
2.2.3.12	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Mikrotiterplattenformat)	42
2.2.3.13	Expression von Proteinen im zellfreien System (Reticulozyten)	42
2.2.3.14	GST-Bindungsstudien	42
2.2.3.15	<i>In vitro</i> Phosphorylierung mit Erk1 Kinase	42
2.2.3.16	<i>In vitro</i> Methylierung mit immunopräzipitiertem G9a	43
2.2.3.17	<i>In vitro</i> SUMOylierung	43
2.2.3.18	Tandem affinity purification	44
2.2.4	Identifikation von Interaktionspartnern auf RZPD Protein-Microarrays	48
2.2.4.1	Herstellung einer radioaktiv markierten Proteinsonde	48
2.2.4.2	Hybridisierung der RZPD Protein-Microarray PVDF-Membran	49
2.2.4.3	Detektion gebundener Proteine	49
2.2.4.4	Identifikation von Interaktionspartnern / Auswertung	50
2.2.5	Reportergenstudien	51

2.2.6	Zellkultur	52
2.2.6.1	Zelllinien	52
2.2.6.2	Transiente Transfektion	52
2.2.6.3	Virale Infektion	52
2.2.7	Immunofluoreszenz	52
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>Tandem affinity purification (TAP) zur Identifikation von C/EBP<math>\beta</math>-assozierten Proteinkomplexen</b>	<b>53</b>
3.1.1	Generierung von stabil exprimierenden C/EBP $\beta$ -TAP Zelllinien	53
3.1.2	Reinigung von C/EBP $\beta$ -TAP Komplexen	54
<b>3.2</b>	<b>Hybridisierung von Protein-Macroarrays zur Identifikation von Bindungspartnern</b>	<b>55</b>
3.2.1	Generierung einer Proteinsonde aus der transaktivierenden Domäne (CR1-4) von C/EBP $\beta$	58
3.2.2	Identifikation von Interaktionspartnern	59
3.2.3	Auswahl von C/EBP $\beta$ Interaktionspartnern	60
<b>3.3</b>	<b>N-CoR und das verwandte Molekül N-CoR2 binden an die C/EBP<math>\beta</math> TAD</b>	<b>62</b>
<b>3.4</b>	<b>Lysin-Methylierung von C/EBP<math>\beta</math> durch G9a führt zu transkriptioneller Repression</b>	<b>63</b>
3.4.1	G9a interagiert mit C/EBP $\beta$ in GST-Bindungs- und Koimmunopräzipitationsstudien	63
3.4.2	C/EBP $\beta$ ist an Lysinresten methyliert und die Methylierung kann durch G9a verstärkt werden	65
3.4.3	Die G9a SET-Domäne ist verantwortlich für die transkriptionelle Repression von C/EBP $\beta$	68
3.4.4	C/EBP $\beta$ und G9a kolokalisieren im Zellkern	70
<b>3.5</b>	<b>Die Notch1 IC Domäne ist ein Koaktivator für die C/EBP<math>\beta</math>-abhängige Transkription</b>	<b>71</b>
3.5.1	NICD bindet C/EBP $\beta$ in GST-Bindungs- und Koimmunopräzipitationsexperimenten	71
3.5.2	Endogene Notch1 IC- und C/EBP $\beta$ -Proteine interagieren miteinander	72
3.5.3	CR4 in C/EBP $\beta$ vermittelt die Bindung an Notch1 IC	73
3.5.4	Notch1 IC wirkt als Koaktivator für C/EBP $\beta$	74
3.5.4.1	Notch1 IC erhöht die C/EBP $\beta$ -abhängige Transkription in Reporterstudien	74
3.5.4.2	Notch1 IC erhöht die transkriptionelle Aktivität von C/EBP $\beta$ bei der Aktivierung differenzierungsspezifischer Gene im Chromatin	76
3.5.5	C/EBP $\beta$ wirkt der Aktivierung von CSL/RBP-J $\kappa$ durch Notch1 IC entgegen	77



<b>3.6</b>	<b>Untersuchungen zur SUMOylierung von C/EBP<math>\beta</math></b>	<b>78</b>
3.6.1	PIAS3 und Ubc9 binden die regulatorische Region von C/EBP $\beta$ im Hefe-Zwei-Hybrid-System	78
3.6.2	PIAS-Proteine verstärken die SUMOylierung von C/EBP $\beta$ <i>in vitro</i>	78
3.6.3	C/EBP $\beta$ -SUMO-1 interagiert mit der SP-RING Domäne von PIAS3	79
3.6.4	C/EBP $\beta$ CR6-SUMO-1 ist die minimale Interaktionsdomäne für die Interaktion mit PIAS3	84
3.6.5	C/EBP $\beta$ interagiert nicht mit PIASy	85
3.6.6	PIAS3 ist ein SUMO-abhängiger C/EBP $\beta$ Repressor	85
3.6.7	PIAS-Proteine rekrutieren Arginin-Methyltransferasen	88
3.6.8	SUMOylierung und Phosphorylierung von C/EBP $\beta$ sind <i>in vitro</i> unabhängig voneinander	89
<b>3.7</b>	<b>Detektion von Interaktionspartnern auf Protein-Microarrays mit radioaktiv markierten Proteinsonden der C/EBP<math>\beta</math> RD in SUMO-1-modifizierter und unmodifizierter Form</b>	<b>90</b>
3.7.1	Generierung einer SUMO-1-modifizierten Proteinsonde aus der RD (CR567) von C/EBP $\beta$	91
3.7.2	Identifikation von SUMO-1-abhängigen Interaktionspartnern der regulatorischen Domäne von C/EBP $\beta$	93
3.7.3	Auswahl von Interaktionspartnern der C/EBP $\beta$ TAD	94
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>95</b>
<b>4.1</b>	<b>Tandem affinity purification führte nicht zur Identifikation von neuen Interaktionspartnern</b>	<b>95</b>
<b>4.2</b>	<b>Identifikation von neuen Interaktionspartnern auf Protein-Microarrays</b>	<b>96</b>
<b>4.3</b>	<b>Neue Interaktionspartner der C/EBP<math>\beta</math> TAD</b>	<b>97</b>
4.3.1	Mitglieder der Polycomb-Familie	97
4.3.2	Interaktionspartner die auf neue posttranslationale Modifikationen von C/EBP $\beta$ hinweisen	98
4.3.3	Moleküle in Signaltransduktionskaskaden	102
4.3.4	Transkriptionsfaktoren und Koregulatoren	105
<b>4.4</b>	<b>Interaktion und Repression von SUMO-1-modifiziertem C/EBP<math>\beta</math> durch PIAS3</b>	<b>106</b>
<b>4.5</b>	<b>Neue Interaktionspartner der C/EBP<math>\beta</math> regulatorischen Domäne</b>	<b>108</b>
4.5.1	Bindungspartner der RD in ihrer nicht-SUMOylierten Form	108
4.5.2	Bindungspartner der RD in ihrer SUMOylierten und nicht-SUMOylierten Form	110
4.5.3	Bindungspartner der RD in ihrer SUMOylierten Form	110
<b>4.6</b>	<b>Abschließende Bemerkungen</b>	<b>112</b>

<b>Anhang</b>	<b>113</b>
<b>Danksagung</b>	<b>119</b>
<b>Erklärung</b>	<b>120</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>121</b>
<b>Veröffentlichungen</b>	<b>123</b>
<b>Quellenverzeichnis</b>	<b>124</b>

## Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) reguliert die Genexpression, Proliferation und Differenzierung in verschiedenen Zelltypen. Die Funktion von C/EBP $\beta$  wird durch Interaktionen mit einer Reihe von Kofaktoren moduliert, die Bestandteile von Chromatin-verändernden oder Transkriptions-regulierenden makromolekularen Maschinen sind. Die Identifikation und funktionelle Charakterisierung dieser Kofaktoren trägt maßgeblich zum Verständnis der Biologie von C/EBP $\beta$  bei.

C/EBP $\beta$  wird zudem in vielfältiger Weise posttranslational reguliert. Beispielsweise kann C/EBP $\beta$  phosphoryliert, SUMOyliert, acetyliert und an mehreren Positionen an Arginin- und Lysinresten methyliert werden. Die SUMOylierung von C/EBP $\beta$  gilt als Schlüsselmodifikation, die nachfolgende Modifikationen steuert und zu einer Veränderung der genregulatorischen Eigenschaften von C/EBP $\beta$  führt. C/EBP $\beta$  bindet an zwei Enzyme der SUMOylierungsmaschinerie, Ubc9 und PIAS3. Es konnte gezeigt werden, dass PIAS3 nicht nur als E3-Ligase bei der SUMOylierungsreaktion dient, sondern auch mit SUMO-modifiziertem C/EBP $\beta$  interagieren und als transkriptioneller Repressor wirken kann.

Um weitere Interaktionspartner von C/EBP $\beta$  zu identifizieren wurde ein System zur Proteom-weiten Identifikation von Bindungspartnern etabliert. Dazu wurden radioaktiv markierbare Proteinsonden hergestellt, welche die Identifikation von Bindungspartnern auf Protein-Macroarrays ermöglichten. Neben der transaktivierenden Domäne (TAD) wurde die regulatorische Region in ihrer SUMOylierten und nicht-modifizierten Form in Screening-Experimenten eingesetzt. Eine Vielzahl von neuen C/EBP $\beta$ -Bindungspartnern konnte identifiziert werden, wobei die konstitutive SUMOylierung C/EBP $\beta$ -Interaktionen verändern kann. Bei den identifizierten Proteinen handelt es sich um Mitglieder der Polycomb Gruppe, Chromatin-modifizierende Enzyme, Signaltransduktionsmoleküle und transkriptionelle Koregulatoren.

Wissenschaftlich besonders interessant war die Identifikation der Lysin-Methyltransferase H3-K9-HMTase 3 (G9a) als Bindungspartner der transaktivierenden Region von C/EBP $\beta$ . Diese Interaktion wurde durch GST-Bindungs- und Koimmunopräzipitationsstudien bestätigt. Durch massenspektrometrische Analysen konnte Monomethylierung der Aminosäuren K39 und K168 in C/EBP $\beta$  nachgewiesen werden. Dadurch ergab sich die Vermutung, dass G9a nicht nur die Methylierung von Histon H3 katalysiert, sondern auch für die Methylierung und Regulation von C/EBP $\beta$  verantwortlich ist. Rekombinantes C/EBP $\beta$  konnte durch G9a *in vitro* methyliert werden. Koexpression von C/EBP $\beta$  und G9a führte zu einer Reduktion der transaktivierenden Eigenschaften von C/EBP $\beta$  in Abhängigkeit von der katalytischen SET-Domäne von G9a. Dieser Reduktion konnte durch Mutation der Aminosäuren K39 und K168 in Alanin entgegengewirkt werden.

Als Bindungspartner der C/EBP $\beta$  TAD konnte außerdem die intrazelluläre Domäne von Notch1 (NICD) identifiziert werden. Der Notch-Signalweg ist ein evolutionär konservierter Genschalter, der an vielen Entscheidungen in der Entwicklung sowie bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen im adulten Organismus, wie z. B. akuter lymphatischer T-Zell Leukämie (T-ALL), beteiligt ist. Die Interaktion zwischen Notch1 IC und C/EBP $\beta$  konnte in GST-Bindungsexperimenten und Koimmunopräzipitationsstudien verifiziert werden. In Reportergeräten wurde eine Stimulation der C/EBP $\beta$ -abhängigen Transkription durch NICD beobachtet. C/EBP $\beta$  ist demnach ein Zielmolekül des Notch1-Signalweges.

Manntje, Manntje, Timpe Te,  
Buttje, Buttje in der See,  
mine Fru, de Ilsebill,  
will nich so, as ik wol will.

Jacob und Wilhelm Grimm

## Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
bZIP	„basic leucine zipper“
CBP	„Calmodulin binding peptide“
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CR	„Conserved Region“, konservierte Region
CTP	Cytosintriphosphat
DAPI	Diamidino-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
FCS	„Fetal Calf Serum“, fötales Kälberserum
G418	Geneticin
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HDAC	Histon-Deacetylasen
HRP	„Horseradish Peroxidase“
IB	Immunoblot
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid
kD	Kilodalton
M	Molar
MAPK	„Mitogen-activated protein kinase“

MCS	„Multiple cloning site“
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„Phosphate buffered saline“
PCR	„Polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PKA	Proteinkinase A
P/S	Penicillin/Streptomycin
RD	Regulatorische Domäne
RLU	„Relative light units“, relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„Rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	„Sodiumdodecylsulfate“, Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SuPr-1	SUMO-1 Protease-1
Tab.	Tabelle
TAD	Transaktivierende Domäne
TAE	Tris-acetat-EDTA-Puffer
TAP	„Tandem affinity purification“
TBS	„Tris buffered saline“
TTP	Thymidintriphosphat
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

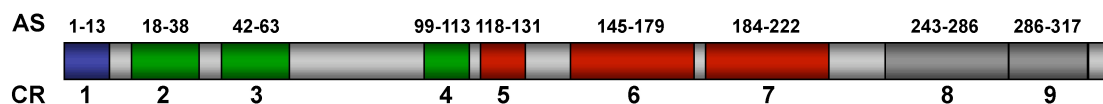
## 1. Einleitung

Die eukaryotische Expression von Genen wird durch Transkriptionsfaktoren gesteuert, welche an *cis*-regulatorische DNA-Sequenzen binden. Diese Transkriptionsfaktoren werden in ihrer Aktivität durch eine Vielzahl von Proteinen beeinflusst. Der Transkriptionsfaktor C/EBP $\beta$  interagiert mit verschiedenen Koaktivatoren oder -repressoren, wie Chromatin-modifizierenden Molekülen, Enzymen und Komplexen, die Bindungen an die basale Transkriptionsmaschinerie vermitteln. Um die Zell-, Gen- und Promotor-spezifische Regulation von C/EBP $\beta$  bei der Entwicklung und Homöostase zu verstehen, ist es notwendig, die signalabhängige zeitliche Abfolge der Interaktionen zwischen dem Transkriptionsfaktor und neuen bzw. bekannten Multiproteinkomplexen in der Zelle zu entschlüsseln.

### 1.1 Struktur und Funktion der CCAAT/Enhancer Binding Proteine

CCAAT/Enhancer Binding Proteine (C/EBPs) sind Transkriptionsfaktoren, welche die Genexpression bei unterschiedlichen biologischen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose regulieren. C/EBPs werden in verschiedenen Geweben und Zellarten exprimiert, unter anderem im Fettgewebe, in der Leber, der Lunge, im Darm und in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Ramji und Foka, 2002). Sie sind entscheidend für die Entwicklung und Funktion von diversen Zelltypen wie zum Beispiel Hepatozyten (Buck *et al.*, 1999), Adipozyten (Cao *et al.*, 1991), Osteoblasten (Hata *et al.*, 2005) und Makrophagen (Screpanti *et al.*, 1995).

Die Familie besteht aus mindestens sechs funktionell verwandten DNA-bindenden Proteinen (C/EBP $\alpha$ -C/EBP $\zeta$ ), wobei die Mitglieder C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$  und C/EBP $\epsilon$  einen ähnlichen Aufbau ihrer funktionellen Domänen besitzen (Ramji und Foka, 2002). Sequenzvergleiche zwischen verschiedenen Spezies und Mitgliedern der Proteinfamilie zeigen neun konservierte Bereiche („conserved regions“, CR1-9), welche durch Alanin-, Glycin und Prolin-reiche Sequenzen getrennt sind (Kowenz-Leutz *et al.*, 1994). Die konservierten Bereiche können in eine transaktivierende Region (CR1-4), eine negativ regulatorische Region (CR5-7), eine DNA-bindende Region (CR8) und eine dimerisierende Region (CR9) eingeteilt werden. CR8 und CR9 bilden zusammen die bZIP-Domäne der Proteine (siehe auch Kap. 1.1.1). Nach funktionellen Kriterien sind C/EBP $\beta$  Proteine aus Mensch, Maus, Ratte und Huhn praktisch nicht zu unterscheiden. Abb. 1.1 zeigt schematisch die Position der konservierten Domänen von C/EBP $\beta$  des Huhns mit dazugehöriger Aminosäureposition.



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung von C/EBP $\beta$  des Huhns (modifiziert nach Kowenz-Leutz *et al.*, 1994).** Aminosäurepositionen (AS) sind oben, konservierte Regionen („conserved regions“, CR) sind unterhalb des Proteins dargestellt. Die konservierten Regionen sind in blau (CR1), grün (CR2-4), rot (CR5-7) und dunkelgrau (CR8-9) dargestellt. Dazwischen liegen hellgraue Bereiche mit einem geringen Grad an Konservierung und einem hohen Anteil an Alanin, Glycin und Prolin. Die konservierten Regionen 2, 3 und 4 sind Bestandteile der transaktivierenden Region. Die rot markierten Bereiche 5, 6 und 7 bilden die regulatorische Region. Dunkelgraue Bereiche zeigen die DNA-Bindungs- und Dimerisierungsregion (CR8-9). CR1, AS 1-13; CR2, AS 18-38; CR3, AS 42-63; CR4, AS 99-113; CR5, AS 118-131; CR6, AS 145-179; CR7, AS 184-222; CR8-9, AS 243-317.

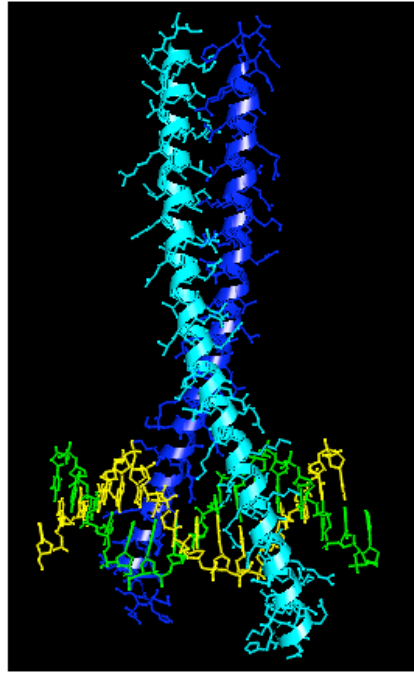
Von dem C/EBP $\beta$  Transkript werden drei Protein-Isoformen, LAP\*, LAP und LIP, durch alternative Translationsinitiation exprimiert (Calkhoven *et al.*, 2000). Die zwei transkriptionell aktiven Isoformen, LAP\* und LAP unterscheiden sich in einem kurzen N-terminalen Stück (CR1). Die kürzeste Isoform, LIP, besitzt nur einen Teil der zentralen regulatorischen Region (CR7) und den bZIP Dimerisierungs- und DNA-bindenden Teil des Proteins. Diese Isoform wird als transkriptioneller Repressor angesehen (Descombes und Schibler, 1991).

Mäuse mit einer Deletion des C/EBP $\beta$  Gens zeigen Veränderungen der Glucose Homöostasis (Croniger *et al.*, 1997) und weisen Störungen in der Makrophagenfunktion auf (Tanaka *et al.*, 1995). Die Tiere entwickeln lymphoproliferative Erkrankungen (Screpanti *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997) und die Weibchen zeigen Infertilität (Sterneck *et al.*, 1997). Der Einfluss von C/EBP $\beta$  auf so vielfältige physiologische Prozesse zeigt die Wichtigkeit des Transkriptionsfaktors für die normale Entwicklung und Funktion von Organismen.

### 1.1.1 Die C/EBP $\beta$ „basic leucine zipper“ Domäne

C/EBP gehört zur Familie der „basic leucine zipper“ (bZIP) Proteine. Die C-terminalen Regionen der Proteine zeigen eine Identität ihrer Aminosäuresequenz von über 90 % und bestehen aus einer basischen DNA-bindenden Domäne und einer Dimerisierungsdomäne (leucine zipper). Leucine zipper finden sich unter anderem in einer Reihe von Transkriptionsfaktoren und vermitteln die Fähigkeit homo- und heteromerer Interaktionen. Sie bilden eine amphipathische Helix aus, bei der sich an jeder siebenten Position ein konserviertes Leucin befindet. Die Leucin-Reste stehen aus der  $\alpha$ -Helix an einer Flanke heraus und können mit den Leucin-Resten des anderen Proteins interagieren. Auf diese Weise bilden sich coiled-coil Strukturen aus. Zwei rechts-gewundene Helices sind dabei so miteinander verwunden, dass alle 3,5 Aminosäurereste eine Windung entsteht und sich das Muster alle sieben Aminosäuren wiederholt. Die zwei leucine zipper bilden den Stamm einer Y-förmigen Struktur und die basischen Regionen der dimerisierenden Proteine zweigen davon ab. Diese basischen Aminosäuren sind für die Bindung an DNA verantwortlich. Die Erkennungssequenz ist folglich palindromisch und wird von jedem bZIP-Faktor erkannt. Die Fähigkeit der Proteine zur Dimerisierung ist somit eine notwendige Voraussetzung für die Bindung an DNA und die Funktion als Transkriptionsfaktor (Landschulz *et al.*, 1989). Die räumliche Struktur der bZIP-Domäne in Verbindung mit DNA wurde bereits aufgeklärt (Tahirov *et al.*, 2002). Abb. 1.2 zeigt die Kristallstruktur eines bZIP-Homodimers, welches an ein DNA-Oligonukleotid gebunden ist.





**Abb. 1.2: Kristallstruktur einer dimerisierten bZIP-Region (CR8-9) von C/EBP $\beta$  gebunden an DNA.** Die zwei bZIP-Proteine sind in blau und türkis dargestellt. Die DNA-Stränge sind in grün und gelb gezeigt. Die .pdb-Datei, welche die Daten der Kristallstruktur enthält, wurde aus Tahirov *et al.* (2002) entnommen und mit dem Programm 3D-Mol dargestellt.

### 1.1.2 Die C/EBP $\beta$ transaktivierende Domäne

Im Gegensatz zu den DNA-bindenden Domänen ist relativ wenig über die Struktur von transaktivierenden Domänen (TAD) bekannt. Die amino-terminal gelegenen konservierten Regionen CR1-4 bilden die transaktivierende Domäne von C/EBP $\beta$ . CR1 ist in der Lage den SWI/SNF Komplex zur ATP-abhängigen Remodellierung von Nukleosomen zu rekrutieren (Kowenz-Leutz und Leutz, 1999). Die C/EBP $\beta$  transaktivierende Domäne ist dabei in der Lage, die Kernkomponente des SWI/SNF-Komplexes, hBrm/BRG1 (SWI2 Homolog), zu binden und auf diese Weise transkriptionell abgeschaltete Gene durch Veränderung der lokalen Chromatinstruktur zu aktivieren.

Durch Acetylierung von Histon-Proteinen kann es zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur und transkriptionellen Aktivierung von Genen kommen. Deacetylierung hingegen wird mit einer Repression der Genexpression in Verbindung gebracht. C/EBP $\beta$  ist in der Lage, die Histon-Acetyltransferase p300/CBP über seinen Amino-Terminus zu binden (Oelgeschlager *et al.*, 1996; Mink *et al.*, 1997). Bei diesen Proteinen handelt es sich um Koaktivatoren, welche verschiedene Transkriptionsfaktoren mit der basalen Transkriptionsmaschinerie verbinden. Diese Assoziation wird durch regulatorische virale Proteine wie Adenovirus E1A oder SV40 T verhindert. C/EBP $\beta$  bindet an p300/CBP über dessen E1A-Interaktionsmodul.

Neben aktivierenden werden auch reprimierende Proteinkomplexe über die C/EBP $\beta$  TAD rekrutiert. Die Interaktion zwischen der TAD von C/EBP $\beta$  und SMRT/N-CoR2 konnte kürzlich gezeigt werden (Ki *et al.*, 2005). N-CoR und das eng verwandte SMRT/N-CoR liegen in makromolekularen Proteinkomplexen unterschiedlicher Komposition vor und sind mit Histon-deacetylierenden Enzymaktivitäten assoziiert.

Die Transaktivierungsregion von C/EBP $\beta$  ist also in der Lage, unterschiedliche Koaktivatoren und Korepressoren zu binden, welche die Chromatinstruktur verändern und die Genexpression beeinflussen können.

### 1.1.3 Die C/EBP $\beta$ regulatorische Domäne

Die konservierten Regionen 5, 6 und 7 bilden die regulatorische Domäne (RD) von C/EBP $\beta$ . In Reportergenstudien konnte gezeigt werden, dass eine interne Deletion der Aminosäuren 116-229 (CR5, 6 und 7) die Transaktivierung von C/EBP $\beta$  fünf- bis siebenfach im Vergleich zum Gesamtprotein verstärkt (Kowenz-Leutz *et al.*, 1994). Deshalb wurde für diese Region eine negativ-regulatorische Funktion postuliert. Eine Deletion von Region 5, 7 oder einer Kombination aus 5 und 7 führten ebenfalls zu einer fünf- bis siebenfachen Aktivierung des Proteins (Kowenz-Leutz *et al.*, 1994). Die Motive 5 und 7 reprimieren also einen Teil des transaktivierenden Potentials von C/EBP $\beta$ . Im Gegensatz dazu scheint CR6 den inhibitorischen Effekt der Regionen 5 und 7 zum Teil aufzuheben. Eine Deletion der Region 6 führt zu einer starken Reduktion der Reporterexpression. Die Anwesenheit der CR6 hingegen führt zu einer Maskierung des negativen Effektes der Regionen 5 bzw. 7. Die aktivierenden und reprimierenden Funktionen von C/EBP $\beta$  sind dabei unabhängig von den C-terminal gelegenen Dimerisierungs-/DNA-Bindungsregionen. Die CR6 scheint demnach für die Derepression von C/EBP $\beta$  von entscheidender Bedeutung zu sein.

Eine Derepression kann auf physiologischem Wege durch Phosphorylierung über den Ras-MAPK-Signalweg erreicht werden (Kowenz-Leutz *et al.*, 1994). Diese Phosphorylierung an der MAPK Phosphoakzeptorsequenz in der CR7 an Aminosäureposition T220 führt zu einer Konformationsänderung des Proteins und der aminoterminal gelegenen Transaktivierungsdomäne. Das Repressormolekül wird so durch das Ras Onkoprotein in einen Aktivator überführt. Aktive und reprimierte C/EBP $\beta$ -Formen interagieren mit Mediator Multiproteinkomplexen über deren CRSP complex subunit 3 (CRSP130/Sur2) Untereinheit. Die CRSP complex subunit 3 Untereinheit findet sich in zwei unterschiedlichen Typen von Mediator-Komplexen: CRSP70-haltige Komplexe werden mit transkriptioneller Aktivierung, CDK8-haltige Komplexe vorwiegend mit transkriptioneller Repression in Verbindung gebracht. Phosphorylierung über den Ras-Signalweg führt zur Assoziation von C/EBP $\beta$  mit dem aktiven, CRSP70-haltigen Mediator-Komplex, welcher den Transkriptionsfaktor mit der basalen Transkriptionsmaschinerie verbinden und zelluläre Stimuli in Genexpression übersetzen kann (Mo *et al.*, 2004).

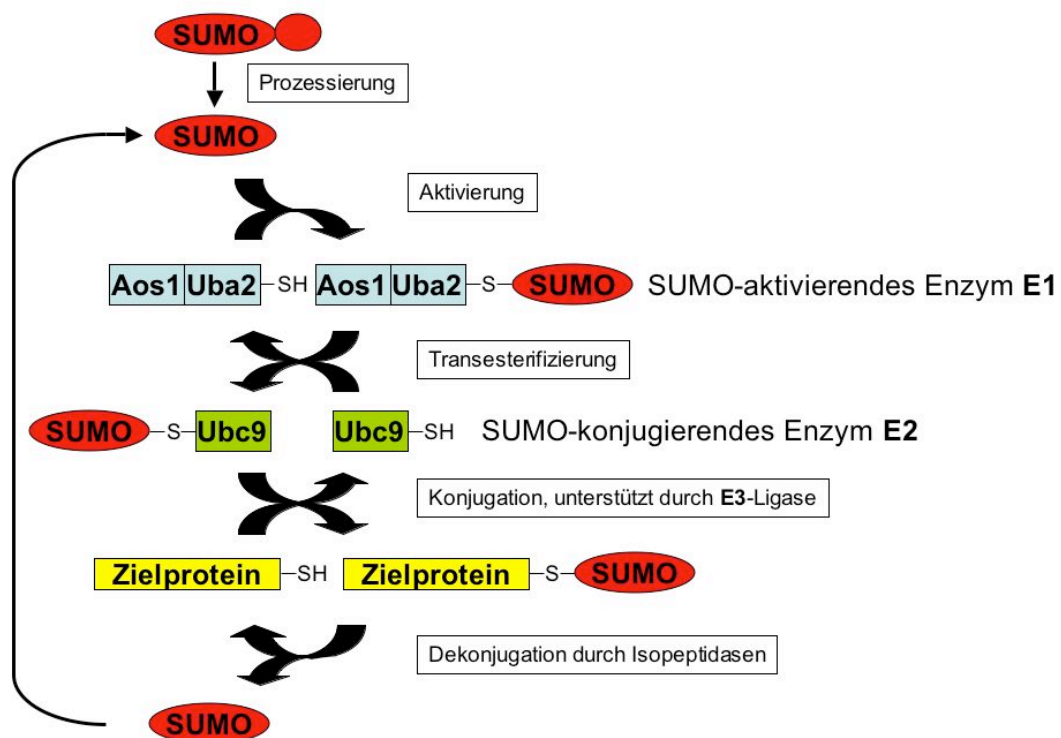
Computer-gestützte Analysen zeigen eine potentielle SUMO-Akzeptorsequenz ( $\Psi$ KXE,  $\Psi$  steht für eine hydrophobe Aminosäure; siehe auch Kap. 1.2) in allen C/EBP-Proteinen. Das Lysinmolekül, an welches SUMO konjugiert wird, ist in allen Mitgliedern der C/EBP-Familie und zwischen verschiedensten Spezies konserviert (Berberich-Siebelt *et al.*, 2006). Dieser hohe Grad an Konservierung lässt auf eine wichtige biologische Funktion dieses Motivs schließen. SUMOylierung von C/EBP $\alpha$  (Subramanian *et al.*, 2003), C/EBP $\beta$  (Eaton und Sealy, 2003; Berberich-Siebelt *et al.*, 2006) und von C/EBP $\epsilon$  (Kim *et al.*, 2002) konnte bereits *in vivo* nachgewiesen werden. Mutationen der SUMO-Akzeptorsequenzen haben Änderungen der Proteinaktivitäten zur Folge.

## 1.2 Modifikation durch „Small Ubiquitin-like Modifiers“

Ubiquitin und Ubiquitin-verwandte Proteine („ubiquitin-like proteins“, Ubls) werden kovalent an Proteine gebunden, ändern die Eigenschaften der durch sie modifizierten Substrate und führen zu einer Erhöhung der Komplexität des Proteoms (Hay, 2005). Der „Small Ubiquitin-like Modifier“ (SUMO) ist ein ca. 100 Aminosäuren großer Vertreter dieser Familie, welcher nur etwa 20 % Sequenzhomologie zu Ubiquitin zeigt, jedoch über eine ähnliche räumliche Struktur verfügt (Bayer *et al.*, 1998). Die Verteilung der geladenen Aminosäuren auf der Oberfläche und der N-terminale Teil des Proteins unterscheiden sich stark voneinander und deuten auf einen funktionellen Unterschied zwischen SUMO und Ubiquitin hin. SUMO Proteine finden sich in vielfältigen eukaryotischen Organismen wie z. B. Hefen, Nematoden, Fruchtfliegen und Säugern (Johnson, 2004). In multizellulären Organismen findet SUMO-Konjugation in allen Geweben und allen Entwicklungsstadien des Organismus statt (Johnson, 2004). Die SUMO-Familie umfasst vier Mitglieder in Säugern: SUMO-1, -2, -3 und -4. SUMO-1 besitzt keine weiteren SUMOylierungsmotive; SUMO-2 bis -4 hingegen besitzen weitere SUMO-Akzeptorsequenzen und können somit verzweigte Vernetzungen (Analog zur Ubiquitinierung) bilden. Die kovalente Konjugation findet an einem oder mehreren Lysinresten von Substratproteinen statt. Als konservierte SUMO-Akzeptorsequenz wurde das Motiv  $\Psi$ KXE ermittelt, wobei  $\Psi$  für eine große hydrophobe Aminosäure (Leucin, Isoleucin, Valin oder Phenylalanin) steht und K das SUMOylierte Lysin. Darüber hinaus findet Konjugation von SUMO an davon abweichende Motive statt.

Seit der Entdeckung von SUMO vor ca. 10 Jahren konnte SUMO-Modifikation an vielen Proteinen festgestellt werden. Die modifizierten Substrate spielen eine Rolle bei unterschiedlichsten zellulären Funktionen wie z. B. Transkription, DNA-Reparatur, Kerntransport, Signaltransduktion und Zellzykluskontrolle (Johnson, 2004). Genetische Studien haben darüber hinaus auf einen möglichen Einfluß von SUMO auf die Dynamik von Chromatin-Strukturen hingewiesen. Die gemeinsame Eigenschaft von SUMO in all diesen Prozessen ist die Änderung der Substrat-Interaktionen mit anderen Makromolekülen. Dieser Einfluß ist jedoch für jedes SUMO-Substrat spezifisch.

Dieser Prozess der SUMOylierung findet analog zur Ubiquitinierung statt, erfordert also neben SUMO-Proteinen drei enzymatische Funktionen (Abb. 1.3). Der erste Schritt wird durch die SUMO-aktivierenden Enzyme Aos1 und Uba2 (E1-Funktion), der zweite durch das SUMO-konjugierende Enzym Ubc9 (E2-Funktion) und der dritte Schritt durch die SUMO Protein-Ligasen PIAS, RanBP2 oder Pc2 (E3-Funktion) katalysiert.



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung des SUMO Reaktionsweges (modifiziert nach Jaffray und Hay, 2006).** Das unprozessierte SUMO-Vorläuferprotein wird durch eine SUMO-spezifische Protease gespalten und es entstehen zwei endständige Glycine am C-Terminus des Proteins. Das prozessierte Protein wird durch das E1-Enzym (Uba2/Aos1) gebunden und mit ATP aktiviert. Durch eine Transesterifizierungsreaktion wird SUMO nachfolgend auf das E2 SUMO-konjugierende Enzym (Ubc9) übertragen. SUMO kann nun an das Substratprotein konjugiert werden. Dieser Schritt wird bei einigen Substratproteinen durch E3-Ligasen (PIAS, RanBP2 oder Pc2) unterstützt. Die SUMOylierung kann durch SUMO-spezifische Proteasen vom Substratprotein entfernt werden.

Katalysiert wird die SUMOylierung durch eine Enzymkaskade in Abhängigkeit von ATP. Um die SUMO-Proteine kompetent für die nachfolgenden Reaktionen zu machen, müssen mehrere Aminosäuren von ihrem C-Terminus proteolytisch entfernt werden, so dass zwei endständige Glycine entstehen. Das SUMO-aktivierende Enzym E1, bestehend aus einem Uba2-Aos1-Heterodimer, bindet daraufhin die C-terminal trunkeierten SUMO-Moleküle. Es entsteht eine energiereiche Thioester zwischen SUMO und Uba2. Nachfolgend wird SUMO auf das einzig bekannte E2-Enzym, Ubc9, transferiert. Es entsteht erneut eine Thioester-Bindung zwischen Ubc9 und SUMO. Durch strukturelle Untersuchungen eines Substrat-Ubc9-Komplexes konnte gezeigt werden, dass Ubc9 für die direkte Erkennung der Konsensus-Sequenz und SUMO-Konjugation verantwortlich ist (Bernier-Villamor *et al.*, 2002). *In vitro* kann eine SUMOylierungs-Reaktion deshalb mit rekombinanten E1, E2 und SUMO-1-GG in Abhängigkeit von ATP durchgeführt werden. Die Anwesenheit einer E3-Ligase ist nicht erforderlich, um einen Transfer auf das Substratprotein zu ermöglichen. Die SUMO E3s wirken eher als Adaptoren, welche mit Ubc9-SUMO interagieren und den Transfer von SUMO auf spezifische Substratproteine verstärken. Die Isopeptid-Bindung wird letztendlich zwischen der endständigen Carboxylgruppe des letzten Glycins von SUMO und der  $\gamma$ -Aminogruppe des Lysins in einem SUMO-Motiv geknüpft. SUMOylierte Substrate können durch SUMO-spezifische Isopeptida-

sen der SENP-Familie dekonjugiert werden. Dies ist für eine dynamische Regulation SUMO-abhängiger Prozesse von entscheidender Bedeutung: In einer eukaryotischen Zelle liegt zu jeder Zeit nur ein kleiner Anteil (1-5 % der Gesamtproteinmenge) eines bestimmten Substrats in der SUMOylierten Form vor. Bei einer Lyse der Zellen bewirken die Proteasen eine rasche Dekonjugation assoziierter SUMO-Proteine.

Bisher konnte für drei Proteinfamilien eine E3-Ligase-Aktivität gezeigt werden: RanBP2 (Pichler *et al.*, 2002), das Polycomb-Protein Pc2 (Kagey *et al.*, 2003) und die PIAS Proteine (Johnson und Gupta, 2001; Kahyo *et al.*, 2001; Sachdev *et al.*, 2001). Die E3-Ligasen besitzen spezifische subzelluläre Lokalisationen: RanBP2 ist mit dem Kernporenkomplex assoziiert (Pichler *et al.*, 2002), die PIAS-Proteine befinden sich im Nukleoplasma (Sachdev *et al.*, 2001; Kotaja *et al.*, 2002) und Pc2-Proteine lokalisieren in „Polycomb bodies“ (Kagey *et al.*, 2003). Die Lokalisation der SUMO E3-Ligasen vermittelt demnach vermutlich funktionelle Spezifität.

### 1.3 Funktionelle Änderungen von Transkriptionsfaktoren durch SUMOylierung

Extrazelluläre Stimuli beeinflussen die posttranslationale Modifikation von Transkriptionsfaktoren über unterschiedliche Signalwege und modulieren dadurch die Aktivität dieser Proteine. Dies führt zu dynamischen Veränderungen bei der Genexpression. Die funktionellen Konsequenzen der Phosphorylierung für die Regulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren konnte bereits in vielen Fällen gezeigt werden. In den letzten Jahren wurde darüber hinaus deutlich, dass weitere posttranslationale Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung und SUMOylierung die Aktivität von Transkriptionsfaktoren zusätzlich beeinflussen können. Die Modifikation mit SUMO hat vielfältige Konsequenzen für Mitglieder dieser Proteinfamilie. Sie ändert die Stabilität, die intrazelluläre Lokalisation, die Aktivität und die DNA-bindenden Eigenschaften der Substratproteine (Gill, 2003).

#### 1.3.1 Repression durch SUMO-Konjugation

In den meisten Fällen scheint eine Konjugation von SUMO die Aktivität von Transkriptionsfaktoren zu reprimieren (Gill, 2003). Dies wurde für eine Vielzahl von Proteinen, wie z. B. Sp3 (Ross *et al.*, 2002; Sapetschnig *et al.*, 2002), Elk-1 (Yang *et al.*, 2003), c-Myb (Bies *et al.*, 2002), C/EBP (Kim *et al.*, 2002; Subramanian *et al.*, 2003) und Steroidhormonrezeptoren (Poukka *et al.*, 2000; Abdel-Hafiz *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2002) gezeigt. Die SUMO-Akzeptorsequenz liegt dort meistens in einer Domäne mit inhibitorischer Funktion. Die SUMO-Modifikation scheint jedoch nicht zu einer Änderung der DNA-bindenden Eigenschaften zu führen (Sachdev *et al.*, 2001; Sapetschnig *et al.*, 2002), sondern die Ausbildung neuer Protein-Protein-Wechselwirkungen zu ermöglichen. Dies führt in der Regel zur Inhibition des Transkriptionsfaktors, da neue Bindungsstellen für Korepressormoleküle, wie beispielsweise Histon-Deacetylasen (HDACs), geschaffen werden (Gill, 2004). SUMOylierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 verstärkt die Assoziation mit der Histon-Deacetylase HDAC2 (Yang und Sharrocks, 2004). SUMO-modifiziertes p300, nicht jedoch unmodifiziertes p300, ist in der Lage, mit HDAC6 zu assoziieren (Girdwood *et al.*, 2003). Die Repression von Transkriptionsfaktoren durch SUMOylierung kann durch die Wirkung spezifischer SUMO-Proteasen, wie z. B. SuPr-1, aufgehoben werden. Auf diese Weise können Proteine wie p300, Sp3 oder Elk-1 de-reprimiert werden (Ross *et al.*, 2002; Girdwood *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003).

### 1.3.2 Aktivierung durch SUMO-Konjugation

Die SUMOylierung von Transkriptionsfaktoren führt in der Regel zu deren Repression. Es gibt jedoch auch Beispiele für eine Aktivierung durch SUMOylierung. Dies konnte zum einen für die „heat shock factors“ HSF1 und HSF2 (Goodson *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2001; Hietakangas *et al.*, 2003) und zum anderen für den Transkriptionsfaktor Tcf-4 gezeigt werden (Yamamoto *et al.*, 2003). Die Tcf-4-abhängige Transkription wird durch Koexpression von  $\beta$ -Catenin und PIASy verstärkt und diese Aktivierung ist bei einer Mutation der SUMO-Akzeptorsequenz reduziert.

### 1.3.3 Änderung der subnukleären Lokalisation durch SUMO

SUMO-Konjugation ist ein Mechanismus zur Regulation der subnukleären Lokalisation von Transkriptionsfaktoren, welcher indirekt Einfluß auf deren transkriptionelle Eigenschaften nimmt.

SUMOylierung von RanGAP1 stimuliert die Assoziation mit RanBP2 am Kernporenkomplex und reguliert so die subzelluläre Lokalisation von RanGAP1 (Mahajan *et al.*, 1998; Matunis *et al.*, 1998). Die subnukleäre Lokalisation von Transkriptionsfaktoren kann ebenfalls durch SUMO-Modifikation reguliert sein. Dies wurde beispielsweise für den Transkriptionsfaktor Sp3 gezeigt (Ross *et al.*, 2002). Reprimiertes, SUMO-modifiziertes Sp3 akkumuliert an der nukleären Peripherie und in „nuclear dots“. Transkriptionell aktives, nicht-SUMOyliertes Sp3 hingegen zeigt ein diffuses Verteilungsmuster im Kern. Promyelocytic leukemia (PML) ist das namensgebende Protein der PML-Kernkörperchen und integraler Bestandteil dieses subnukleären Kompartiments. Es handelt sich hierbei um ein Tumorsuppressor, welcher in promyelozytischer Leukämie in mutierter Form vorliegt. SUMOylierung von PML ist eine notwendige Voraussetzung für die Bildung von PML-Körperchen und die Rekrutierung transkriptioneller Regulatoren, wie beispielsweise Sp100 oder CBP, in diese nukleären Strukturen (Sternsdorf *et al.*, 1999). Es wurde deshalb vorgeschlagen, dass PML-Körperchen Orte zur Lagerung SUMOylierter Substrate sind (Hay, 2005). Die Funktion der PML-Körperchen ist nicht abschließend geklärt. Viele Transkriptionsfaktoren, Koaktivatoren und Korepressoren kolokalisieren jedoch mit diesen Strukturen und scheinen an der Regulation von Transkriptionsfaktoraktivität beteiligt zu sein (Zhong *et al.*, 2000). Sp100 ist eine Komponente der PML-Körper und interagiert mit HP1a. Diese Assoziation wird *in vitro* durch SUMOylierung verstärkt. HP1a ist in der Lage, repressive Chromatinstrukturen auszubilden. SUMOylierung könnte in diesem Zusammenhang einen Mechanismus zur Rekrutierung von Kernproteinen in repressive Chromatinbereiche darstellen (Hay, 2005).

### 1.3.4 Änderung der Proteinstabilität durch SUMO

Lysinreste können posttranslational acetyliert, ubiquitiniert, methyliert und SUMOyliert werden. SUMO kompetitiert demnach mit anderen posttranslationalen Modifikationen um Substrat-Lysine (Gill, 2003).

Die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B wird auf unterschiedlichen Ebenen reguliert, vor allem aber durch die Bindung an das Inhibitormolekül I $\kappa$ B $\alpha$  im Cytoplasma. Durch extrazelluläre Signale wird I $\kappa$ B $\alpha$  an einem bestimmten Lysinrest ubiquitiniert und degradiert. SUMOylierung an dem gleichen Lysinrest kann die Ubiquitinierung verhindern und stabilisiert so das Protein (Desterro *et al.*, 1998). Auf diese Weise kann die Repression von NF- $\kappa$ B aufrechterhalten werden. Für den Transkriptionsfaktor Sp3 konnte gezeigt werden, dass ein bestimmter Lysinrest entweder SU-

MOyliert oder acetyliert werden kann und diese Modifikationen einen Einfluss auf die Aktivität des Proteins haben (Braun *et al.*, 2001).

### 1.3.5 Änderung der Proteinkonformation durch SUMO

SUMOylierung kann jedoch auch eine Änderung der Konformation des Substratproteins bewirken. Dies wurde bislang nur für das DNA-Reparaturenzym Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) gezeigt (Steinacher und Schar, 2005). Eine konformationelle Änderung von Transkriptionsfaktoren durch SUMO wurde hingegen noch nicht beschrieben.

## 1.4 SUMOylierung führt zur Modulation von Protein-Protein-Interaktionen

Posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierung und Ubiquitinierung, verändern Protein-Protein-Interaktionen. Dies scheint auch für SUMOylierung der Fall zu sein. Die Interaktion zwischen RanBP2 und Ran-GAP1 kann beispielsweise nur stattfinden, wenn letzteres Protein in seiner SUMOylierten Form vorliegt (Mahajan *et al.*, 1997; Matunis *et al.*, 1998). Die SUMO-1 Konjugation an p300 führt zur Rekrutierung von HDAC6 (Girdwood *et al.*, 2003), die Modifikation von Elk-1 zur Bindung von HDAC2 (Yang und Sharrocks, 2004). Daher liegt die Schlußfolgerung nahe, dass die Modifikation durch SUMO neue Bindungsstellen für Interaktionspartner schafft. Eine direkte Modulation der Aktivität der modifizierten Proteine durch eine Konformationsänderung scheint dabei eher eine Ausnahme zu sein. Die SUMO-Konjugationsmotive befinden sich nämlich in der Regel in unstrukturierten Proteinbereichen, wie im Fall von p53 (Rodriguez *et al.*, 1999), oder an herausragenden Schleifenstrukturen, wie für Ran-GAP1 gezeigt wurde (Bernier-Villamor *et al.*, 2002). Darüber hinaus scheinen die Modifikationsstellen keine spezifische Sekundärstruktur zu besitzen (Lin *et al.*, 2002). Wenn SUMO also eine Bindungsmöglichkeit für neue Interaktionspartner schafft, so könnte in diesen Proteinen ein SUMO-bindendes Motiv vorhanden sein. Dieses konnte unter Zuhilfenahme von NMR-Technologie und „site-directed mutagenesis“ auf das Motiv (V / I-X-V / I-V / I) eingegrenzt werden, welches sich in unterschiedlichsten SUMO-bindenden Proteinen wie z. B. PIASx, PML, SAE2/Uba2 und RanBP2 findet (Song *et al.*, 2004). Interessanterweise findet sich dieses Motiv neben PIASx auch in allen Mitgliedern der PIAS-Familie, mit Ausnahme von PIASy (siehe Abb. 1.4). PIASy scheint demnach nicht die Fähigkeit zu besitzen, SUMO-Peptide zu binden. Trotzdem ist eine E3-Ligase-Funktion für PIASy postuliert worden (Sachdev *et al.*, 2001) und PIASy kann selbst an Lys-35 mit SUMO modifiziert werden (Ihara *et al.*, 2005).

## 1.5 SUMOylierung ist essentiell für die Organisation und Funktion des Zellkerns

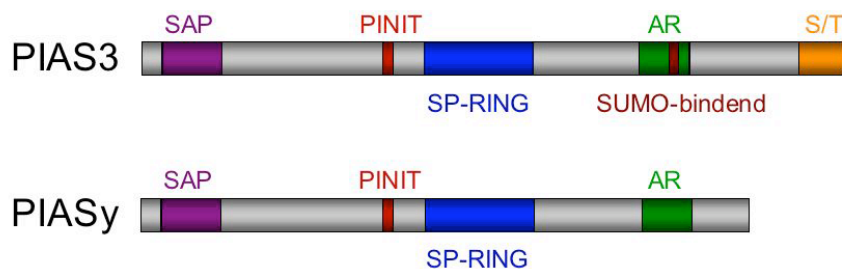
Die Inaktivierung von Ubc9 und der damit verbundene vollständige Verlust der zellulären SUMOylierung führt zu drastischen phänotypischen Effekten. Ubc9-defiziente Embryos sterben in einer frühen Entwicklungsphase durch schwere Chromosomenkondensations- und Segregationsdefekte (Nacerddine *et al.*, 2005). Zudem kommt es zu Störungen der nukleären Organisation durch Fehlentwicklung der Kernmembran, der Nukleoli und PML-Körperchen. RanGAP1 kann in Ubc9<sup>-/-</sup>-Zellen nicht mehr mit dem Kernporenkomplex assoziieren und es kommt zu einer fehlerhaften Verteilung von Ran.

## 1.6 „Protein inhibitor of activated STAT“

„Protein inhibitor of activated STAT“ (PIAS) Proteine wurden als spezifische Kofaktoren identifiziert, die die DNA-bindenden Eigenschaften und transkriptionelle Aktivierung der STAT Transkriptionsfaktoren reduzieren (Chung *et al.*, 1997). Im Laufe der Zeit wurde deutlich, dass PIAS-Proteine transkriptionelle Koregulatoren in unterschiedlichsten zellulären Signaltransduktionskaskaden sind (Shuai und Liu, 2005). Neben dem STAT Signalweg werden z. B. Steriodhormon-Signalwege beeinflusst. Abhängig vom biologischen Kontext kann es zu einer Aktivierung oder Repression eines bestimmten Signalwegs kommen.

PIAS Proteine besitzen E3 SUMO-Ligase Aktivität. Es wird angenommen, dass sie die Interaktion zwischen dem energiereichen Ubc9-SUMO Thioester und dem Substrat stabilisieren und so die Katalyse beschleunigen. Darüber hinaus besitzt PIAS im C-terminalen Teil des Proteins SUMO-bindende Motive, mit denen SUMO direkt gebunden werden kann. Studien an funktionell inaktiven PIAS-Proteinen führten zu der Vermutung, dass PIAS-Proteine zudem eine E3 SUMO Ligase-unabhängige Funktion besitzen (Sachdev *et al.*, 2001; Megidish *et al.*, 2002; Gross *et al.*, 2004).

Bislang wurden fünf PIAS-Proteine in Säugetieren identifiziert: PIAS1, PIAS3, PIASx und PIASy. Soweit bekannt existieren von allen PIAS-Proteinen, mit Ausnahme von PIAS1, jeweils zwei Isoformen, die sich nur geringfügig voneinander unterscheiden: PIAS3 und PIAS3L, PIASx $\alpha$  und PIASx $\beta$  und PIASy und PIASyE6. Die Proteine der PIAS-Familie zeigen eine über 40%ige Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz. Verschiedene funktionelle Domänen und Motive sind zwischen den Mitgliedern der Familie konserviert (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung der PIAS Proteine.** Die obere Abb. zeigt die Domänenstruktur von PIAS3. Sie zeigt die N-terminal gelegene SAP-Domäne, das PINIT Motiv, die für die SUMO-Katalyse relevante SP-RING Domäne, die saure Region („acidic region“, AR) mit dem SUMO-bindenden Motiv und die C-terminal gelegene Serin/Threonin-reiche Region (S/T). Diese Domänenstruktur ist auch bei den hier nicht gezeigten Vertretern der Proteinfamilie (PIAS1, PIASx $\alpha$  und PIASx $\beta$ ) stark konserviert. Abweichend davon zeigt PIASy eine C-terminale Verkürzung des Proteins und ein Fehlen des SUMO-bindenden Motives.

N-terminal gelegen befindet sich eine SAP-Domäne. Dabei handelt es sich um ein 35 Aminosäuren große Domäne, welche nach den Proteinen SAF-A/B, Acinus und PIAS (SAP) benannt wurde. Proteine mit SAP-Domänen können an unterschiedlichen Prozessen wie Transkription, DNA-Reparatur, RNA-Prozessierung und Degradation des Chromatins bei Apoptose beteiligt sein. SAP-Domänen können A+T-reiche DNA-Sequenzen erkennen und binden, welche in „scaffold-attachment regions“ (SARs) vorhanden sind. Diese SARs könnten dafür verantwortlich sein, Chromatinschleifen an der nukleären Matrix zu verankern und somit indirekt einen Einfluß auf die Transkription ausüben. *In vitro* konnte eine Bindung von PIAS1 und PIASy an A+T-



reiche DNA bereits gezeigt werden (Sachdev *et al.*, 2001). Die Struktur der SAP-Domäne von PIAS1 wurde mittels NMR-Spektroskopie gelöst und zeigt eine „four-helix-bundle“ Struktur (Okubo *et al.*, 2004). Innerhalb dieser konservierten Domäne befindet sich ein LXXLL-Koregulator Motiv, welches beispielsweise für die transkriptionelle Repression von STAT1 oder den Androgen-Rezeptor durch PIASy verantwortlich ist (Gross *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001).

Die katalytische Funktion der E3-Ligase befindet sich in der SP-RING-Domäne der PIAS-Proteine. Neben PIAS besitzen die Hefepoteine Siz1 und Siz2 diese RING-Finger-ähnliche Zink-bindende Domäne (SP-RING steht für Siz/PIAS-RING) (Johnson und Gupta, 2001). Dem SP-RING-Finger fehlen zwei der Cysteine, welche in allen RING-Finger Proteinen konserviert sind. Darüber hinaus weicht der Abstand der einzelnen Zink-koordinierenden Cysteine in der SP-RING-Domäne von dem in RING-Domänen von E3-Ubiquitin-Ligasen ab. Durch Mutation von nur einer konservierten Aminosäure kann die SUMO-E3-Ligase Aktivität der PIAS-Proteine ausgeschaltet werden (Kotaja *et al.*, 2002). PIAS ist in der Lage über seinen SP-RING sowohl mit Ubc9 als auch dem Substrat zu interagieren und so die SUMOylierungsreaktion zu erleichtern.

Zusätzlich enthalten PIAS-Proteine ein PINIT-Motiv. Dieser konservierte Bereich scheint für die Retention von PIAS3 im Kern verantwortlich zu sein (Duval *et al.*, 2003), eine Isoform des PIASy-Proteins ohne PINIT-Motiv (PIASyE6<sup>-</sup>) hingegen ist auch im Nukleus lokalisiert (Wong *et al.*, 2004).

Die weiter C-terminal gelegene Region ist reich an sauren Aminosäuren. Sie spielt eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen und hat einen Einfluß auf die E3-Ligase-Aktivität des Proteins, vermutlich durch das SUMO-bindende Motiv in dieser Domäne. PIASy und PIASyE6<sup>-</sup> besitzen dieses Motiv nicht, zeigen jedoch auch E3-SUMO-Ligase Aktivität wie die anderen Mitglieder der Proteinfamilie (Sachdev *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2004). Am C-terminalen Ende der Proteine befindet sich ein Serin-/Threonin-reicher Sequenzabschnitt, dessen Funktion jedoch unklar ist.

In „yeast two-hybrid“ Untersuchungen und Koimmunopräzipitationsstudien konnte gezeigt werden, dass PIAS1 mit STAT1, PIAS3 mit STAT3 und PIASx mit STAT4 interagieren kann. Diese PIAS-STAT-Interaktionen werden Cytokin-abhängig induziert. In Reporterstudien wurde darüber hinaus deutlich, dass PIAS die STAT-abhängige Genaktivierung inhibiert. Neben PIAS1 ist auch PIASy in der Lage, mit STAT1 zu interagieren und die STAT-abhängige Genaktivierung zu hemmen. Dies geschieht jedoch durch unterschiedliche Mechanismen. PIAS1 blockiert die DNA-bindende Aktivität von STAT1, PIASy hingegen scheint als Korepressor von STAT1 zu wirken. Diese Versuche legen nahe, dass die einzelnen PIAS-Proteine sowohl redundante als auch spezifische Funktionen zeigen.

Zur Klärung der physiologischen Funktionen der PIAS-Proteine wurden unterschiedliche „knock-out“ Mäuse generiert. PIAS1<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen einen verstärkten Schutz vor pathogen-induzierten Infektionen. Die IFN- $\gamma$ - bzw. IFN- $\beta$ -vermittelte Induktion von STAT1 kann hier nicht mehr negativ beeinflusst werden (Liu *et al.*, 2004). In der Folge zeigen die Tiere eine verstärkte Immunantwort nach viraler oder bakterieller Infektion. PIASx wird stark in testikulärem Gewebe exprimiert und es existieren zwei Splicevarianten, PIASx $\alpha$  und PIASx $\beta$ . Es kann demnach auf eine Funktion von PIASx bei der Spermatogenese geschlossen werden. PIASx<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen ein reduziertes Testisgewicht, eine erhöhte Apoptoserate testikulärer Zellen und reduzierte Spermienanzahl. Die Tiere sind jedoch fertil und haben eine normale Qualität der Spermien (Santti *et al.*, 2005). PIASy<sup>-/-</sup> Mäuse scheinen phänotypisch normal zu sein (Roth *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2004). Einer neuen Studie zufolge führt die Überexpression von PIASy in humanen Fibroblasten jedoch zu zellulärer Seneszenz durch Veränderung von p53- und Rb-Tumor-Suppressor-Signalwegen (Bischof *et al.*, 2006).

Von PIAS3 hingegen ist keine „knock-out“ Maus publiziert worden, deshalb existieren zu diesem Protein recht wenige Daten, die Hinweise auf die physiologische Funktion

des Proteins geben. PIAS3 wird im Verlauf der Adipogenese und im ausdifferenzierten weißen Fettgewebe konstitutiv exprimiert und während dieses Prozesses aus dem Zellkern exportiert (Deng *et al.*, 2006). Erhöhte Expressionsniveaus von PIAS3 wurden zudem im weißen Fettgewebe von „obese“ (ob/ob) Mäusen gefunden. PIAS3 könnte deshalb an der Pathophysiologie der Fettleibigkeit beteiligt sein. Konstitutive nukleäre Expression von PIAS3 in 3T3-L1 Präadipozyten führte zudem zu einer Inhibition der Expression Adipozyten-spezifischer Gene (Deng *et al.*, 2006).

In *Drosophila melanogaster* existiert nur ein PIAS-Gen: dPIAS/Zimp/Su(var)2-10. Ein Verlust der dPIAS-Allele geht mit Abnormalitäten bei der Chromosomenkondensation und Segregation einher. dPIAS scheint daher unterschiedliche Funktionen bei der Etablierung und dem Erhalt der Chromosomenorganisation in Interphasekernen zu übernehmen (Hari *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurde ein Defekt bei der Augen- und Blutentwicklung in *Drosophila* beobachtet, falls kein dPIAS in den Zellen exprimiert wird (Betz *et al.*, 2001). Die Autoren dieser Studie postulieren, dass dPIAS als Tumorsuppressorgen wirkt. Unterschiedlichste Arbeiten zeigen, dass aktives STAT3 in einer Reihe von humanen Tumoren vorliegt (Jove, 2000) und als Onkogen wirkt (Bromberg *et al.*, 1999). Mutationen in humanem PIAS3 könnten also eine ständige Aktivierung von STAT3 ermöglichen, welche zur Ausbildung von Tumoren führen könnte.

## 1.7 Posttranslationale Modifikationen von C/EBP $\beta$

Posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung und SUMOylierung, spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Stabilität und der transkriptionellen Aktivität von Transkriptionsfaktoren.

Auf die funktionelle Modulation von C/EBP $\beta$  durch ras-MAPK Phosphorylierung wurde bereits in Kapitel 1.1.3 eingegangen. Diese Phosphorylierungsstelle an Thr-220 im Huhn ist auch in anderen Spezies konserviert (Thr-235 im Menschen (Nakajima *et al.*, 1993) und Thr-188 in der Ratte (Hanlon *et al.*, 2001). Neben dieser wurden weitere Akzeptorsequenzen identifiziert, welche durch unterschiedliche Kinasen phosphoryliert werden können: „Glycogen-synthase kinase 3“ (GSK-3) phosphoryliert Ser-184 in murinem LAP (Ser-33 in LIP) (Piwien-Pilipuk *et al.*, 2001), „calcium/calmodulin-dependent protein kinase“ phosphoryliert Ser-276 (Wegner *et al.*, 1992), Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert Ser-105 und Ser-240, Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert Ser-105, Ser-299 und Ser-240 von LAP (Trautwein *et al.*, 1993; Trautwein *et al.*, 1994; Chinery *et al.*, 1997), „p90 ribosomal S kinase“ (p90rsk) phosphoryliert Ser-105 im C/EBP $\beta$  der Ratte und Thr-217 von murinem LAP (Buck *et al.*, 1999) und Cdk2 und Cdc2 phosphorylieren Ser-64 und Thr-189 (Shuman *et al.*, 2004). In unserer Arbeitsgruppe wurde eine Reihe weiterer Phosphorylierungsstellen durch massenspektrometrische Analysen von affinitätsgereinigtem C/EBP $\beta$  identifiziert. Zusammenfassend wird C/EBP $\beta$  durch unterschiedliche Signalwege an verschiedenen Positionen phosphoryliert und in seiner Aktivität verändert.

Die Acetylierung von C/EBP $\beta$  wurde in zwei unterschiedlichen Publikationen vorgeschlagen (Xu *et al.*, 2003; Joo *et al.*, 2004). In einer detaillierteren Studie wurde der Einfluss von Acetylierung an Position Lys-39 der murinen Sequenz untersucht (Cesena *et al.*, 2007). Dabei stellte sich heraus, dass die Mutation der N-terminalen Acetylierungsstelle von C/EBP $\beta$  die transkriptionelle Aktivierung des C/EBP $\alpha$ -, des C/EBP konsensus- und des *c-fos*-Promotors vermindert.

C/EBP $\alpha$  kann an Lysin-159 mit SUMO-1 oder SUMO-3 modifiziert werden und die Mutation K159A führt zu einem Verlust der SUMO Konjugationsmöglichkeit (Subramanian *et al.*, 2003). Folglich ist K159 die einzige SUMO-Akzeptorsequenz in C/EBP $\alpha$ . Darüber hinaus wurde gezeigt, dass C/EBP $\alpha$  mit Ubc9 interagiert und *in vitro* SUMOyliert werden kann. Die E3-Ligase PIASy kann die Konjugation von

SUMO-1 und SUMO-3 an C/EBP $\alpha$  *in vitro* und *in vivo* verstärken. Für C/EBP $\epsilon$  konnte gezeigt werden, dass eine kovalente Bindung von SUMO-1 an Lysin-121 in der regulatorischen Region I erfolgen kann (RDI inhibitory domain). Diese Modifikation wurde mit einem Verlust der inhibitorischen Funktion der regulatorischen Domäne in Verbindung gebracht (Kim *et al.*, 2002).

Um die *in vivo* Relevanz der SUMOylierung von C/EBP $\beta$  zu verstehen, wurden „knock-in“ Mäuse mit einer Mutation in der SUMO-Akzeptorsequenz generiert (K133A) (Begay und Leutz, unpubliziert). Diese Tiere werden derzeit charakterisiert.

Arbeiten in unserer Forschungsgruppe haben darüber hinaus gezeigt, dass C/EBP $\beta$  durch Methylierung an Argininresten modifiziert werden kann (Kowenz-Leutz, Knoblich, Vermeulen, Mann und Leutz, unpubliziert) und dass Mutationen dieser Seitengruppen die Aktivität und die biologische Funktion von C/EBP $\beta$  verändern können (Kowenz-Leutz und Leutz, unpubliziert). Bislang konnten zwei methylierte Arginine durch massenspektrometrische Untersuchungen identifiziert werden (R60 und R295). Katalysiert werden diese Modifikationen durch verschiedene Protein-Arginin-N-Methyltransferasen (PRMTs), welche Mono- sowie symmetrische und asymmetrische Dimethylierung der Guanidino-Stickstoffatome bewirken können.

Durch massenspektrometrische Untersuchungen an immunopräzipitiertem C/EBP $\beta$  konnte außerdem Methylierung an verschiedenen Lysin-Resten identifiziert werden (Knoblich, Vermeulen, Mann und Leutz, unpubliziert). Bisher konnte monomethyliertes Lysin an zwei Positionen nachgewiesen werden (K39 und K168). K39 kann interessanterweise auch in acetylierter Form vorliegen (Cesena *et al.*, 2007). Eine kompetitive Situation zwischen den beiden Modifikationen an dieser Stelle ist demnach sehr wahrscheinlich.

C/EBP $\beta$  wird also an vielen Positionen durch vielfältige posttranslationale Modifikationen verändert. Für einige der Phosphorylierungsstellen des Proteins sind die Signalwege, die beteiligten Enzyme und funktionellen Konsequenzen der Modifikationen z. T. bekannt. Bei SUMOylierung und Acetylierung sind die Folgen für das Protein nicht abschließend verstanden und die Signalwege, die diese Modifikationen steuern, sind unzureichend charakterisiert. Methylierungen an Arginin- oder Lysinresten stellen eine vollkommen neue Klasse von posttranslationalen Modifikationen an Transkriptionsfaktoren dar. Die funktionellen Konsequenzen für die Proteine sind weitgehend unbekannt.

## 1.8 Ziele der Arbeit

Der ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) verfügt über drei funktionelle Module. Der N-terminale Bereich bildet die Transaktivierungsdomäne. Im zentralen Bereich des Moleküls befindet sich eine regulatorische Region und C-terminal schließt sich die bZIP-Region mit einer DNA-Bindungs- und einer Dimerisierungsdomäne an. C/EBP $\beta$  ist mit unterschiedlichen Koaktivator- bzw. Korepressorkomplexen assoziiert, wie z. B. dem SWI/SNF-Komplex und unterschiedlichen Mediator-Komplexen, die die Aktivität des Transkriptionsfaktors regulieren.

In dieser Studie sollten weitere Interaktionspartner von C/EBP $\beta$  identifiziert werden, um die Mechanismen bei der Gen- und Chromatinregulation durch C/EBP $\beta$  zu verstehen. In einem proteom-weiten Ansatz sollte die Frage beantwortet werden, welche Proteine bzw. Proteinkomplexe an die amino-terminal gelegene transaktivierende Region und an die zentral im Protein gelegene regulatorische Region in Abhängigkeit ihres SUMOylierungsstatus gebunden werden können. Diese putativen Interaktionspartner sollten zunächst in Gruppen eingeteilt werden und die Bindung der interessantesten Kandidaten in unabhängigen Studien überprüft werden. Anschließend sollte ihre Funktion im Kontext von C/EBP $\beta$  geklärt werden und somit neue Aspekte der Biologie von C/EBP $\beta$  entschlüsselt werden.

C/EBP $\beta$  wird durch vielfältige posttranslationale Modifikationen in seiner Aktivität reguliert. SUMOylierung der zentralen regulatorischen Region scheint dabei eine Schlüsselmodifikation zu sein, welche nachfolgende Modifikationen beeinflusst. Darüber hinaus ist C/EBP $\beta$  in der Lage, zwei Enzyme der SUMOylierungsmaschinerie, Ubc9 und PIAS3, zu binden. Die funktionellen Konsequenzen der Modifikation durch SUMO und die Interaktion mit der SUMO E3-Ligase PIAS3 wurden im zweiten Teil der Arbeit untersucht.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Chemikalien**

30% Acrylamide/Bis Solution, 29:1 (3.3% C) (Biorad, Produkt-Nr. 161-0156)

6-Aminohexansäure (Merck, Produkt-Nr. 800145)

Ammoniumperoxodisulfat (Roth, Produkt-Nr. 9592.2)

Ampicillin Natriumsalz (Roth, Produkt-Nr. K029.2)

Antifoam A (Sigma, Produkt-Nr. A-5633)

ATP (Serva, Produkt-Nr. 10920)

Roti-Block Blocklösung (Roth, Produkt-Nr. A151.1)

Bradford-Reagenz (Sigma, Produkt-Nr. B 6916)

Chloramphenicol (Fluka, Produkt-Nr. 23275)

Coomassie Brilliantblau R-250 (Serva, Produkt-Nr. 35056)

Diamidino-2-phenylindol (AppliChem, Produkt-Nr. A1001,0025)

1,4-Dithiothreitol DTT (Merck, Produkt-Nr. 1.11474.0005)

dNTP (Amersham, Produkt-Nr. 27203501)

EGTA (Fluka, Produkt-Nr. 03778)

Essigsäure (Merck, Produkt-Nr. 1.00062.2500)

Formaldehyd (37%) (Sigma, Produkt-Nr. 47629)

Formamid (Sigma, Produkt-Nr. F9037)

Guanidin-thiocyanat (Fluka, Produkt-Nr. 50990)

Hefeextrakt (BD, Produkt-Nr. 212720)

HEPES N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (Calbiochem, Produkt-Nr. 391338)

Imidazol (Sigma, Produkt-Nr. I5513)

IPTG Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactosid (Roche, Produkt-Nr. 11411446001)

Kaliumacetat (Merck, Produkt-Nr. 1.04820.5000)  
 Kanamycin Sulfat (Gibco, Produkt-Nr. 11815-032)  
 Lithiumchlorid (Fluka, Produkt-Nr. 62476)  
 Lithiumdodecylsulfat (Sigma, Produkt-Nr. L4632)  
 Magnesiumacetat (Merck, Produkt-Nr. 5819)  
 2-Mercaptoethanol (Sigma, Produkt-Nr. M3148)  
 Methanol (Roti, Produkt-Nr. 4627.2)  
 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (Sigma, Produkt-Nr. M-5057)  
 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (Roth, Produkt-Nr. 6979.3)  
 Natriumacetat (Merck, Produkt-Nr. 1.06268.1000)  
 Natriumcarbonat (Merck, Produkt-Nr. 1.06392.1000)  
 Natriumchlorid (Merck, Produkt-Nr. 1.06404.5000)  
 Natriumcitrat (Sigma, Produkt-Nr. S1804)  
 Natriumthiosulfat (Sigma, Produkt-Nr. HT1005)  
 N-Lauroylsarcosin (Sigma, Produkt-Nr. S-4641)  
 Nonidet P40 Substitute (NP-40) (Fluka, Produkt-Nr. 74385)  
 Phenylmethansulfonylfluorid (Sigma, Produkt-Nr. P7626-5G)  
 Ponceau S (Serva, Produkt-Nr. 33429)  
 Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (Tabletten) (complete, EDTA-frei) (Roche, Produkt-Nr. 1873580)  
 Roti Histofix 4% Formaldehyd pH7 (Roth, Produkt-Nr. P087.3)  
 S-Adenosyl-L-[methyl-<sup>3</sup>H]-methionin (Amersham, Produkt-Nr. TRK865)  
 Salzsäure, rauchend 37% (Roth, Produkt-Nr. X942.2)  
 Silbernitrat (Sigma, Produkt-Nr. S8157)  
 Tetracyclin Hydrochlorid (Sigma, Produkt-Nr. T-3383)  
 Triton X-100 (Serva, Produkt-Nr. 37240)  
 Trizma base (Sigma, Produkt-Nr. T1503)  
 Trypton (MP Biomedicals, Produkt-Nr. 1010817)

Tween 20 (Sigma, Produkt-Nr. P1379)

### **2.1.2 „Kits“**

Amersham Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (Produkt-Nr. 25-2538-01)

BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen, Produkt-Nr. 70584-3)

Dynabeads Oligo(dT)<sub>25</sub> (Invitrogen, Produkt-Nr. 610-02)

Dynabeads Protein G (Invitrogen, Produkt-Nr. 100.04D)

ECL Western blotting detection reagents and analysis system (Amersham, Produkt-Nr. RPN2106)

Megaprime DNA labelling system (Amersham, Produkt-Nr. RPN1605)

Metafectene Transfektionsreagenz (Biontex, Produkt-Nr. T020-1.0)

QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Produkt-Nr. 12163)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Produkt-Nr. 28704)

QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Produkt-Nr. 200518)

TnT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Produkt-Nr. L4610)

### **2.1.3 Enzyme**

Alkalische Phosphatase, Shrimp (Roche, Produkt-Nr. 1785250)

Benzonase Nuklease (Merck, Produkt-Nr. 1.01695.0001)

Erk1 Kinase (Invitrogen, Produkt-Nr. PV3311)

Klenow Enzym (Roche, Produkt-Nr. 1008404)

Lysozym (Serva, Produkt-Nr. 28262)

PfuTurbo DNA Polymerase (Stratagene, Produkt-Nr. 600250)

Proteinkinase A (Sigma, Produkt-Nr. P-2645)

Restriktionsendonukleasen *Bam*H I, *Eco*R I, *Eco*R V, *Hind* III, *Nco* I, *Not* I, *Sal* I, *Xho* I, *Xba* I (Roche, Produkt-Nr. verschieden) oder *Ear* I, *Xcm* I (NEB, Produkt-Nr. verschieden)

Ribonuklease A (Serva, Produkt-Nr. 34388)

T4 DNA-Ligase (Roche, Produkt-Nr. 10481220001)

Taq DNA-Polymerase (AG Leutz)

Thrombin Protease (Amersham, Produkt-Nr. 27-0846-01)

#### **2.1.4 Proteine**

Albumin (BSA) (Boehringer Mannheim, Produkt-Nr. 711454)

Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas, Produkt-Nr. SM 0671)

#### **2.1.5 Antikörper**

anti-C/EBP $\beta$  (Kaninchen, polyklonal, C-19) (Santa Cruz Biotechnology, Produkt-Nr. sc-150)

anti-cC/EBP $\beta$  (Kaninchen, polyklonal) (AG Leutz)

anti-hC/EBP $\beta$  (Kaninchen, polyklonal) (AG Leutz)

anti-FLAG (Maus, monoklonal, M2) (Sigma, Produkt-Nr. F-3165)

anti-GST (Ziege, polyklonal) (Amersham, Produkt-Nr. 27-4577-01)

anti-GFP (Maus, monoklonal, Mischung der Klone 7.1 und 13.1) (Roche, Produkt-Nr. 11814460001)

anti-HA (Maus, monoklonal, HA.11) (Covance, Produkt-Nr. MMS-101R)

anti-HA (Maus, monoklonal, 12CA5) (Roche, Produkt-Nr. 1583816)

anti-pan methyl-Lysin (Kaninchen, polyklonal) (Abcam, Produkt-Nr. ab7315-50)

anti-PIAS3 (Kaninchen, polyklonal, H-169) (Santa Cruz Biotechnology, Produkt-Nr. sc-14017)

anti-Tubulin (Maus, monoklonal, TU-02) (Santa Cruz Biotechnology, Produkt-Nr. sc-5286)

Alexa Fluor 488 gekoppelter anti-Maus IgG (Ziege, polyklonal) (Molecular Probes, Produkt-Nr. A-11008)

Alexa Fluor 555 gekoppelter anti-Kaninchen IgG (Ziege, polyklonal) (Molecular Probes, Produkt-Nr. A-21422)

Alexa Fluor 680 gekoppelter anti-Maus IgG (Ziege, polyklonal) (Molecular Probes, Produkt-Nr. A-21058)

Alexa Fluor 680 gekoppelter anti-Kaninchen IgG (Molecular Probes, Produkt-Nr. A-21100)

Alexa Fluor 680 gekoppelter anti-Ziege IgG (Kaninchen, polyklonal) (Molecular Probes, Produkt-Nr. A-21088)



ECL anti-Kaninchen IgG Horseradish Peroxidase gekoppelter Antikörper (GE Healthcare, Produkt-Nr. NA934V)

ECL anti-Maus IgG Horseradish Peroxidase gekoppelter Antikörper (GE Healthcare, Produkt-Nr. NA931V)

### **2.1.6 Chromatographie**

Anti-FLAG M2 Affinity Gel Freezer-Safe (Sigma, Produkt-Nr. A 2220)

Benzamidine Sepharose 6B (Amersham, Produkt-Nr. 17-0568-01)

Calmodulin-Agarose (Stratagene, Produkt-Nr. 214303)

Chromatographiesäulen „Disposable Columns, 5 ml“ (Qiagen, Produkt-Nr. 1018597)

Glutathione Sepharose 4B (Amersham, Produkt-Nr. 17-0756-01)

IgG-Agarose (Kaninchen) (Sigma, Produkt-Nr. A2909)

Microcon YM-10 (10 kD Ausschluss) (Millipore, Produkt-Nr. 42406)

Nickel Sepharose High Performance (GE Healthcare, Produkt-Nr. 17-5268-01)

### **2.1.7 Bakterien**

Für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurde der *E. coli* Stamm TOP10F' (Invitrogen, Produkt-Nr. C3030-03) verwendet. Abweichend dazu wurde der Stamm TOP10/P3 (Invitrogen, Produkt-Nr. C5050-03) für die Vervielfältigung von *supF*-Gen tragenden Plasmiden (z. B. pcDM8) verwendet. Für die Vervielfältigung von psiRNA-Vektoren wurde der *E. coli* Stamm GT116 Bakterien verwendet.

Für die Expression von Proteinen in *E. coli* wurden verschiedene BL21-Derivate benutzt, welche in Tab. 2.1 zusammengefasst sind.

Bakterienstamm	Eigenschaften	Resistenz
BL21	Besitzt kein Gen für T7 RNA Polymerase, nicht für Expression von Genen geeignet, die unter der Kontrolle von T7 Promotoren stehen.	-
BL21(DE3)	Stamm für die Expression von Genen, die unter der Kontrolle von T7 Promotoren stehen.	-
BL21(DE3)pLysS	Enthält pLysS, welches für T7 Lysozym kodiert. Reduziert die basale Expression von Zielgenen.	Chloramphenicol (34 µg/ml)
BL21(DE3)pLysE	Enthält pLysE. Reduziert die basale Expression von Zielgenen mit einer größeren Stringenz im Vergleich zu pLysS.	Chloramphenicol (34 µg/ml)
Rosetta2	B21-Derivat, welches zusätzlich das pRARE-Plasmid enthält. Dies ermöglicht die Expression von sieben in <i>E. coli</i> selten auftretenden tRNAs, welche die Translationseffizienz erhöhen.	Chloramphenicol (34 µg/ml)

**Tab. 2.1: Verwendete Bakterienstämme zur Expression von Fusionsproteinen.** Detaillierte Informationen zu verwendeten Bakterienstämmen wurden dem „pET System Manual, 10<sup>th</sup> Edition“ (Novagen, 2003) entnommen

### 2.1.8 Zellkultur

Chicken Serum (Gibco, Produkt-Nr. 16110-082)

DMEM (Gibco, Produkt-Nr. 31966-021)

Fetal Bovine Serum (Gibco, Produkt-Nr. 10270-106)

MEM Alpha Medium (Gibco, Produkt-Nr. 32561-029)

Penicillin/Streptomycin (100x) (PAA, Produkt-Nr. P11-010)

RPMI (Gibco, Produkt-Nr. 72400)

Trypsin-EDTA (1x) (PAA, Produkt-Nr. L11-004)

### 2.1.9 Zelllinien

Cos7 (African green monkey kidney) (DSMZ, Produkt-Nr. ACC 60) (Gluzman, 1981)

GP2-293 (auf HEK-293-basierende Zelllinie, exprimiert die viralen *gag* und *pol* Gene)

HEK-293 (human embryonal kidney) (DSMZ, Produkt-Nr. ACC 305) (Graham *et al.*, 1977)

Jurkat (human T cell leukemia) (DSMZ, Produkt-Nr. ACC 282) (Schneider *et al.*, 1977)

K562 (human chronic myeloid leukemia in blast crisis) (DSMZ, Produkt-Nr. ACC 10) (Lozzio und Lozzio, 1975)

MEF<sup>+/+</sup> (murine embryonal fibroblasts) wurden aus 129 Ola X C57Bl/6-Tieren gewonnen

MEF<sup>-/-</sup> (murine embryonal fibroblasts) wurden aus C/EBP $\beta$ <sup>-/-</sup> 129 Ola X C57Bl/6-Tieren (Sterneck *et al.*, 1997) gewonnen

QT6 (quail fibroblasts from *Coturnix coturnix japonica*) (ATCC, Produkt-Nr. CRL-1708) (Moscovici *et al.*, 1977)

### **2.1.10 Laborgeräte**

Bachofer Sonoplus HD70 (Sonifiziergerät)

Beckman Avanti Centrifuge J-25 (Zentrifuge)

Beckman LS6000LL (Flüssig-Szintillationszähler)

Berthold Lumat LB9501 (Luminometer)

Eppendorf Centrifuge 5417R (Zentrifuge)

Hybond-N+ Membran (Amersham, Produkt-Nr. RPN203B)

Li-Cor Automated Sequencer Modell 4000L (Sequenziergerät)

Molecular Devices Spectra Max 250 (Mikrotiterplattenlesegerät)

Li-Cor Odyssey Scanner

Protran Nitrocellulose Transfer Membran (Schleicher&Schuell, Produkt-Nr. 10401196)

Whatman Papier (Schleicher&Schuell, Produkt-Nr. 3030 917)

X-Omat AR Film (Kodak, Produkt-Nr. F5388-50 EA)

### **2.1.11 Oligonukleotidsequenzen und Vektoren**

In Tab. 2.2 sind die für die Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma BioTez (Berlin) synthetisiert und HPLC-gereinigt.

Name	Sequenz
T7	5´- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3´
Sp6	5´- ATT TAG GTG ACA CTA TAG -3´
5´ pMSCV	5´- CCC TTG AAC CTC CTC GTT CGA CC -3´
3´ pMSCV	5´- GAG ACG TGC TAC TTC CAT TTG TC -3´
TAP hLAP* for	5´- CGC GGA TCC GCC GCC ATG GCA CAA CGC CTG GTG GCC TGG -3´
TAP hLAP for	5´- CGC GGA TCC GCC GCC ATG GAA GTG GCC AAC TTC TAC -3´
TAP hLIP for	5´- CGC GGA TCC GCC GCC ATG GCG GCG GGC TTC CCG TAC -3´
TAP hCR89 for	5´- CGC GGA TCC GCC GCC ATG GCG CCC TCG CAG GTC AAG AGC -3´
TAP h rev	5´- CGC GGA TCC GCA GTG GCC GGA GGA GGC GAG -3´
hCR567 <i>Bam</i> H I for	5´- CGC GGA TCC GCC GCC ATG GAC CTC TTC TCC GAC GAC TAC -3´
hCR567 <i>Eco</i> R I rev	5´- GCG GAA TTC TCT TCT TGG CCT TGC TCT TGA C -3´
mPIAS3 C343S for	5´- GCC CTC ACC TCT GCC CAT CTG -3´
mPIAS3 C343S rev	5´- CAG ATG GGC AGA GGT GAG GGC -3´
mPIAS3 <i>Xho</i> I for	5´- CCG CTC GAG GCC GCC ATG GTG ATG AGT TTC CGA GTG -3´
mPIAS3 254 <i>Xho</i> I for	5´- CCG CTC GAG ATG GTC CCC AAC ACC ATC GTA GTT -3´
mPIAS3 260 <i>Xba</i> I rev	5´- CTA GTC TAG ACT AAA CTA CGA TGG TGT TGG GGA C -3´
mPIAS3 369 <i>Xho</i> I for	5´- CCG CTC GAG ATG TGT GAC AAG AAG GCT CCC TAT -3´
mPIAS3 end <i>Xba</i> I rev	5´- CTA GTC TAG ACT AGT CCA AGG AAA TGA CGT CTG A -3´
AP for (Kenner <i>et al.</i> , 2004)	5´- CAC GCG ATG CAA CAC CAC TCA GG -3´
AP rev (Kenner <i>et al.</i> , 2004)	5´- GCA TGT CCC CGG GCT CAA AGA -3´
Ocn for (Kenner <i>et al.</i> , 2004)	5´- ACC CTG GCT GCG CTC TGT CTC T -3´
Ocn rev (Kenner <i>et al.</i> , 2004)	5´- GAT GCG TTT GTA GGC GGT CTT CA -3´
Bsp for (Kenner <i>et al.</i> , 2004)	5´- TAC CGG CCA CGC TAC TTT CTT TAT -3´
Bsp rev (Kenner <i>et al.</i> , 2004)	5´- GAC CGC CAG CTC GTT TTC ATC C -3´

**Tab. 2.2: Verwendete Oligonukleotide für Sequenzierungen, Klonierungen und Mutagenesen.** Die jeweilige Nukleotidsequenz ist vom 5´-Ende dargestellt.

In Tab. 2.3 sind die viralen, eukaryotischen und prokaryotischen Expressionsvektoren aufgelistet, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Virale Expressionsvektoren	Beschreibung/Quelle
pZome	Cellzome
pZome-hLAP*-TAP	5'- <i>Bam</i> HI-3' PCR-Fragment
pZome-hLAP-TAP	5'- <i>Bam</i> HI-3' PCR-Fragment
pZome-hLIP-TAP	5'- <i>Bam</i> HI-3' PCR-Fragment
pZome-CR8-9-TAP	5'- <i>Bam</i> HI-3' PCR-Fragment

Eukaryotische Expressionsvektoren	Beschreibung/Quelle
pcDM8	Invitrogen
pcDM8-cC/EBP $\beta$ LAP*	(Kowenz-Leutz <i>et al.</i> , 1994)
pcDM8-cC/EBP $\beta$ LAP	(Kowenz-Leutz <i>et al.</i> , 1994)
pcDM8-cC/EBP $\beta$ LIP	(Kowenz-Leutz <i>et al.</i> , 1994)
pcDM8-cC/EBP $\beta$ $\Delta$ CR567	(Kowenz-Leutz <i>et al.</i> , 1994)
pcDM8-cC/EBP $\beta$ CR2389	Leutz Labor
pcDM8-cC/EBP $\beta$ CR489	Leutz Labor
pcDM8-cC/EBP $\beta$ $\Delta$ CR4	Leutz Labor
pcDM8-C/EBP $\beta$ LAP* K155A	Leutz Labor
pcDNA3	Invitrogen
pcDNA3-cC/EBP $\beta$ -FLAG	(Kowenz-Leutz <i>et al.</i> , 1994)
pcDM8-cC/EBP $\beta$ CR1-4-Gal4 DBD	Leutz Labor
pcDM8-cC/EBP $\beta$ CR1-3-Gal4 DBD	Leutz Labor
pcDM8-cC/EBP $\beta$ CR4-Gal4 DBD	Leutz Labor
pcDNA1-c-Myb	Leutz Labor
pcDNA3-HA-PIAS3	5'- <i>Xho</i> I, 3'- <i>Xba</i> I, PCR-Fragment
pcDNA3-HA-PIAS3 C343S	5'- <i>Xho</i> I, 3'- <i>Xba</i> I, PCR-Fragment
pcDNA3-HA-PIAS3 1-251	5'- <i>Xho</i> I, 3'- <i>Xba</i> I, PCR-Fragment
pcDNA3-HA-PIAS3 56-366	5'- <i>Xho</i> I, 3'- <i>Xba</i> I, PCR-Fragment
pcDNA3-HA-Ubc9	Zur Verfügung gestellt von Dr. Stefan Müller (MPI Biochemie, München)
pcDNA3-HA-SUMO-1	Zur Verfügung gestellt von Dr. Stefan Müller (MPI Biochemie, München)
pcDNA3-HA-SuPr-1	(Best <i>et al.</i> , 2002)
pcDNA3-hG9a	(Nishio und Walsh, 2004)
pcDNA3-G9a-HA	(Nishio und Walsh, 2004)
pcDNA3-G9a $\Delta$ SET-HA	(Nishio und Walsh, 2004)
pCMV-GFP-G9a	(Nishio und Walsh, 2004)
pCMV-GFP-G9a $\Delta$ SET	(Nishio und Walsh, 2004)
pcDNA3-FLAG-Notch1 IC	(Ansieau <i>et al.</i> , 2001)
pcDNA3-FLAG-Notch1 IC $\Delta$ RAM	(Ansieau <i>et al.</i> , 2001)
pcDNA3-Gankyrin-HA	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. U. Heinemann (MDC, Berlin)
pCMV- $\beta$ -Galactosidase	Clontech
pM82	(Sterneck <i>et al.</i> , 1992a; Sterneck <i>et al.</i> , 1992b)
Hes-1 Reportergenkonstrukte	Zur Verfügung gestellt von Dr. Ryoichiro Kageyama (Nishimura <i>et al.</i> , 1998)

Tab. 2.3: Verwendete virale, eukaryotische und prokaryotische Expressionsplasmide.

RBP-J $\kappa$ Expressionsvektoren	Zur Verfügung gestellt von Dr. Hisanori Kurooka (Kyoto Universität, Japan)
pcDNA3-N-CoR	Leutz Labor
pCMX-N-CoR2/-SMRT	(Chen und Evans, 1995)
pVSV-G	Clontech
psiRNA-h7SK GFP zeo	Invivogen
psiRNA-h7SK GFP zeo siPIAS3	5'- <i>BbsI</i> 3'- <i>BbsI</i>

Prokaryotische Expressionsvektoren	Beschreibung
pGEX-2TK	Amersham
pGEX-2TK-hC/EBP $\beta$ CR1-4	5'- <i>Bam</i> HI, 3'- <i>Ea</i> RI (blunt)
pGEX-2TK-hC/EBP $\beta$ CR567	5'- <i>Bam</i> HI, 3'- <i>Eco</i> RI, PCR-Fragment
pGEX-4T1-cC/EBP $\beta$	5'- <i>Bam</i> HI, 3'- <i>Eco</i> RI, PCR-Fragment
pGEX-4T1-cC/EBP $\beta$ CR1-7	5'- <i>Bam</i> HI, 3'- <i>Eco</i> RI, PCR-Fragment
pGEX-4T1-cC/EBP $\beta$ CR1-4	5'- <i>Bam</i> HI, 3'- <i>Eco</i> RI, PCR-Fragment
pGEX-4T1-cC/EBP $\beta$ CR567	5'- <i>Bam</i> HI, 3'- <i>Eco</i> RI, PCR-Fragment
pGEX-4T1-cC/EBP $\beta$ CR5-6	5'- <i>Bam</i> HI, 3'- <i>Eco</i> RI, PCR-Fragment
pGEX-4T1-cC/EBP $\beta$ CR6-7	5'- <i>Bam</i> HI, 3'- <i>Eco</i> RI, PCR-Fragment
pGEX-4T1-cC/EBP $\beta$ CR6	5'- <i>Bam</i> HI, 3'- <i>Eco</i> RI, PCR-Fragment
pGEX-4T1-cC/EBP $\beta$ CR7	5'- <i>Bam</i> HI, 3'- <i>Eco</i> RI, PCR-Fragment
pGEX-4T1-cC/EBP $\beta$ CR5+7	5'- <i>Bam</i> HI, 3'- <i>Eco</i> RI, PCR-Fragment
pGEX-4T1-cC/EBP $\beta$ LIP	5'- <i>Bam</i> HI, 3'- <i>Eco</i> RI, PCR-Fragment
pRHSUMO	(Mencia und de Lorenzo, 2004)
pBADE12	(Mencia und de Lorenzo, 2004)
pGEX-PIAS1	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Suske (Universität Marburg)
pGEX-PIAS3	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Suske (Universität Marburg)
pGEX-PIASy	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Suske (Universität Marburg)
plX	Qiagen
plX-HA-PIAS3	5'- <i>Nco</i> I, 3'- <i>Sma</i> I
plX-HA-PIAS3 C343S	5'- <i>Nco</i> I, 3'- <i>Sma</i> I
plX-HA-PIAS3 1-251	5'- <i>Nco</i> I, 3'- <i>Sma</i> I
plX-HA-PIAS3 56-366	5'- <i>Nco</i> I, 3'- <i>Sma</i> I
plX-HA-PIAS3 245-619	5'- <i>Nco</i> I, 3'- <i>Sma</i> I
plX-HA-PIAS3 360-619	5'- <i>Nco</i> I, 3'- <i>Sma</i> I
pGEX-Sp100	Zur Verfügung gestellt von Dr. J. Seeler (Institut Pasteur, Paris)
pGEX-Sp100dN2	Zur Verfügung gestellt von Dr. J. Seeler (Institut Pasteur, Paris)
pRm-HA/FLAG-Sp3	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Suske (Universität Marburg) (Sapetschnig <i>et al.</i> , 2002)
p3730-His-Lef1	Zur Verfügung gestellt von Dr. J. Hülsken (ISREC, Lausanne)

Tab. 2.3 (Fortsetzung): Verwendete virale, eukaryotische und prokaryotische Expressionsplasmide.

## 2.2 Methoden

Die Durchführung vieler Experimente erfolgte unter Zuhilfenahme der „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 2005).

### 2.2.1 DNA Methoden

#### 2.2.1.1 Amplifikation von Plasmid-DNA

Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) erfolgte mit Standardtechniken in LB Medium (Ausubel *et al.*, 2005).

##### **LB Medium**

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

pH7 mit 1 N NaOH

#### 2.2.1.2 Transformation von *E. coli*

Transformation von kompetenten *E. coli* wurde nach dem „Transformation using calcium chloride“ Protokoll (Ausubel *et al.*, 2005) durchgeführt. Hoch-effiziente Transformation wurde durch Elektroporation erreicht (Ausubel *et al.*, 2005).

#### 2.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA Präparation im grossen Maßstab wurde mit dem „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“ nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Plasmid-DNA Präparation im kleinen Maßstab wurde je nach Anwendungsbereich nach dem „Boiling Miniprep“ Protokoll (Ausubel *et al.*, 2005) oder mit dem „Promega Wizard Plus SV Miniprep Kit“ (Produkt-Nr. A1460) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 2.2.1.4 Molekulare Klonierungen

Restriktionsendonukleasen wurden mit den optimalen Puffern benutzt. DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe und ihrem Retentionsverhalten aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und UV-Licht spezifischer Wellenlängen sichtbar gemacht.

DNA-Fragmente wurden aus Agarose-Gelen ausgeschnitten und mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ aufgereinigt. Abweichend davon wurden DNA-Fragmente durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion aufgereinigt (Ausubel *et al.*, 2005).

Ligationen wurden mit T4 DNA-Ligase in einem optimalen Puffer nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

DNA mit 3'- oder 5'-Überhängen wurden mit dNTPs und Klenow Enzym nach dem „repairing 3' or 5' overhanging ends to generate blunt ends“ Protokoll (Ausubel *et al.*, 2005) aufgefüllt. Dies ist eine notwendige Voraussetzung, um Ligation von „blunt ends“ zu ermöglichen.

### **2.2.1.5 PCR**

PCR wurde nach Standardprotokollen durchgeführt und für die jeweilige Anwendung modifiziert (Ausubel *et al.*, 2005).

### **2.2.1.6 Mutagenese**

Punktmutationen wurden mit „PfuTurbo“ DNA Polymerase unter Verwendung von Mutagenese-Oligonukleotiden eingefügt. Die Durchführung erfolgte nach den Protokollen des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“. Abweichend davon wurde eine Modifikation des Protokolls durchgeführt (Wang und Malcolm, 1999).

### **2.2.1.7 DNA Sequenzierung**

Rekombinante DNA wurde mit Hilfe des von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) beschriebenen Verfahrens unter Verwendung des „Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kits“ und eines „Li-Cor Automated Sequencers“ (Modell 4000L) analysiert. Alternativ wurde rekombinante DNA von der Firma Invitex (Berlin) und MWG (Ebersberg) sequenziert.

## **2.2.2 RNA Methoden**

### **2.2.2.1 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen**

Die Extraktion von RNA wurde mit Guanidin-thiocyanat durchgeführt.

#### **RNA Lysepuffer**

100 g Guanidin-thiocyanat  
117 ml ddH<sub>2</sub>O  
7,1 ml Natriumcitrat pH7,0 (1M)  
10,6 ml N-Lauroylsarcosin (10%)  
0,1 ml Antifoam A  
0,7 ml 2-Mercaptoethanol pro 100 ml

Im Anschluß wurde eine Phenol-/Chloroform-Extraktion durchgeführt, die RNA mit Isopropanol gefällt und in ddH<sub>2</sub>O mit 0,1% SDS aufgenommen.

### **2.2.2.2 polyA-Selektion von mRNA**

Die Selektion von polyA-haltigen Transkripten wurde mit Oligo(dT)<sub>25</sub> Dynabeads nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Bindung der RNA erfolgte in RNA-Bindungspuffer und das Waschen mit RNA-Waschpuffer.

#### **RNA-Bindungspuffer**

20 mM Tris•Cl (pH7,4)  
1 M LiCl  
2 mM EDTA (pH8,0)  
0,5% Li-Dodecylsulfat



**RNA-Waschpuffer**

10 mM Tris•Cl (pH7,4)  
0,15 M LiCl  
2 mM EDTA (pH8,0)  
0,1% Li-Dodecylsulfat

Nach dem Waschen wurden die Oligo(dT)<sub>25</sub> Dynabeads in RNA-Probenpuffer aufgenommen und die RNA elektrophoretisch aufgetrennt.

**RNA-Probenpuffer**

750 µl Formamid  
75 µl 20x MOPS  
240 µl Formaldehyd (37%)  
225 µl ddH<sub>2</sub>O  
0,02% Bromphenolblau

**2.2.2.3 Elektrophorese von RNA und Northern-Hybridisierung**

RNA wurde mit MOPS-/Formaldehyd-haltigen Agarosegelen aufgetrennt und auf „Hybond-N+“ Nylonmembran gebロットet. Die Hybridisierung der Membran erfolgte mit unterschiedlichen Sonden, welche durch Klenow-Polymerase mit dem „Megaprime DNA labelling system“ mit <sup>32</sup>P-dCTP markiert wurden.

**2.2.3 Biochemische Methoden****2.2.3.1 Eindimensionale SDS-Gelelektrophorese von Proteinen**

SDS-Gelelektrophorese von Proteinen wurde nach der Laemmli-Methode durchgeführt (Ausubel *et al.*, 2005).

**2.2.3.2 Coomassie-Färbungen von SDS-Proteingelen**

SDS-Polyacrylamidgele wurden in Coomassie-Färbelösung angefärbt.

**Coomassie-Färbelösung**

40 % Methanol  
10 % Eisessig  
0,25 g/l Coomassie Brilliantblau R250  
in ddH<sub>2</sub>O

### 2.2.3.3 Silberfärbungen von SDS-Proteingelen (für die Massenspektrometrie)

Zur Silberfärbung von SDS-Proteingelen wurde ein auf der nachfolgenden Referenz basierendes Protokoll verwendet (Shevchenko *et al.*, 1996). Dazu wurden die SDS-Proteingele für 30 min in Fixierlösung behandelt und anschließend häufig mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Sensibilisierung erfolgte für 90 sec in Natriumthiosulfat (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>•5 H<sub>2</sub>O, 20 mg/100 ml). Nach drei weiteren Waschschritten mit ddH<sub>2</sub>O für jeweils 30 sec erfolgte die Behandlung mit Silbernitrat (AgNO<sub>3</sub>, 200 mg/100 ml) für 30 min. Nach drei einminütigen Waschschritten mit ddH<sub>2</sub>O erfolgte die Entwicklung mit Entwicklungslösung solange, bis die Banden die richtige Färbung erhielten. Die Reaktion wurde mit 6% Essigsäure abgestoppt. Im Anschluß wurden die SDS-Proteingele ausgiebig mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und Proteinbanden mit einem Skalpell ausgeschnitten.

#### Silber-Fixierlösung

50 % Methanol  
10 % Eisessig  
in ddH<sub>2</sub>O

#### Entwicklerlösung

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6 g/100 ml)  
37 % Formaldehyd (50 µl/100 ml)  
Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>•5 H<sub>2</sub>O (20 mg/100 ml)  
in ddH<sub>2</sub>O

### 2.2.3.4 Immunoblot und Immunodetektion

Nach erfolgter SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Proteine auf „Nitrocellulose Transfer Membran“ geblottet. Dafür wurde das „Protein Blotting with Semidry Systems“ Protokoll verwendet (Ausubel *et al.*, 2005). Abweichend davon wurden die im Folgenden aufgeführten Transferpuffer verwendet.

#### Kathodenpuffer

25 mM Tris base  
40 mM 6-Aminohexansäure  
20% Methanol

#### Anodenpuffer I

30 mM Tris base  
20% Methanol

#### Anodenpuffer II

300 mM Tris base  
20% Methanol

Die auf die Nitrocellulose-Membran transferierten Proteine wurden mit Ponceau S Lösung gefärbt und durch mehrfaches Waschen mit ddH<sub>2</sub>O entfärbt.

#### Ponceau S Lösung

0,5 g Ponceau S in 1 ml 100% Essigsäure lösen und auf 100 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

Nach dem Transfer wurden die Nitrocellulose-Membranen für 30 min mit Roti-Block Lösung inkubiert. Alle Antikörperverdünnungen wurden in Roti-Block Lösung durch-

geführt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C, die Inkubation mit dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper für 1 h bei RT. Alle Waschschritte erfolgten in PBS mit 0,1% Tween 20. Die Detektion gebundener Antikörper erfolgte durch das „ECL Western blotting detection reagents and analysis system“ nach den Angaben des Herstellers.

In einem ersten Detektionsschritt gebundene Antikörper können von den Nitrocellulose-Membranen entfernt werden. Dafür wird die Membran mit Elutionspuffer bedeckt und bei 70°C für 30-90 min inkubiert. Anschließend steht die Membran für eine erneute Inkubation mit einem Primärantikörper zur Verfügung.

#### **Elutionspuffer**

62,5 mM Tris•Cl (pH6,7)

2% SDS

100 mM 2-Mercaptoethanol

### **2.2.3.5 Koimmunopräzipitation**

Um physikalische Protein-Interaktionen mit Hilfe von Antikörpern *in vivo* nachzuweisen, bedient man sich der Koimmunopräzipitation von Proteinen (Ausubel *et al.*, 2005). Antigene und damit assoziierte Proteine werden dabei mit einem spezifischen Antikörper gebunden. Diese Antigen-Antikörper-Komplexe können an eine sedimentierbare Matrix gebunden und somit aus Lösungen präzipitiert werden. Als Ausgangsmaterial wurden verschiedene eukaryotische Zellen verwendet, von denen Gesamtextrakt hergestellt wurde. Dazu wurden die Zellen geerntet, zwei Mal in PBS gewaschen und 20 min in Lysepuffer aufgeschlossen. Der unten angegebene Lysepuffer wurde je nach untersuchter Protein-Interaktion leicht modifiziert.

#### **Lysepuffer (Standard)**

50 mM Tris•Cl (pH8)

150 mM NaCl

0,1 % NP40

1 mM EDTA

5 mM MgCl<sub>2</sub>

50 µM ZnCl<sub>2</sub>

1 Tablette Proteasen-Inhibitoren-Cocktail

Das unlösliche Zellmaterial wurde anschließend pelletiert (13000 rpm, 10 min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ein Aliquot wurde zur Expressionskontrolle entnommen und der Rest des Überstandes mit 1-5 µg Antikörper für 2 h inkubiert. Die Protein-Antikörper-Komplexe wurden mit Protein A/G-Sepharose für 1 h präzipitiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Affinitätsmatrix abzentrifugiert (1800 rpm, 1 min, 4°C) und vier Mal mit Lysepuffer gewaschen. Abschließend wurde die Affinitätsmatrix mit 4x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt, bei 95°C 3 min aufgekocht und durch SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert. Alternativ zu diesem Protokoll erfolgte die Kopräzipitation von Proteinen mit FLAG-Epitop mittels „Anti-FLAG M2 Affinity Gel Freezer-Safe“ nach den Angaben des Herstellers.

### **2.2.3.6 Expression von Proteinen in *E. coli***

Die Expression von Proteinen in *E. coli* wurde wie beschrieben durchgeführt (Ausubel *et al.*, 2005). Eine 50 ml Vorkultur (LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) wurde mit einer Einzelkolonie inokuliert und 12-15 h bei 37°C in einem Schüttler angezogen. Mit 5 ml dieser Vorkultur wurde eine 500 ml Expressionskultur (LB Medium

mit 100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und diese bis zu einer OD von 0,6 bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1-1 mM) induziert und die Bakterien wurden bei Temperaturen von 16-30°C für 3-8 h inkubiert. Nach dieser Zeitspanne wurden die Bakterien durch Zentrifugation (3500 rpm, 10 min, 4°C) geerntet und die Sedimente bei -70°C eingefroren. Zur Expressionskontrolle wurde 1 ml Bakterienkultur entnommen und die Bakterien abzentrifugiert (13000 rpm, 1 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 50 µl 2x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden 5 min bei 95°C gekocht und anschließend sonifiziert. Die Analyse der Proteinexpression erfolgte durch SDS-PAGE anschließende Färbung mit Coomassie.

#### **2x SDS-PAGE Probenpuffer**

90 mM Tris•Cl (pH6,8)  
20% Glycerol  
2% SDS  
0,02% Bromphenolblau  
0,1 M DTT

Die Expression und Lyse von GST-PIAS3 Fusionsproteinen wurde nach einem Protokoll für RING-Finger Ubiquitin-Ligasen durchgeführt (Yang *et al.*, 2005). Die Anwesenheit von ZnCl<sub>2</sub> in dem Kulturmedium (bis 250 µM) und in den verwendeten Puffern (bis 25 µM) ist dabei entscheidend für die Expression von aktivem Protein.

#### **2.2.3.7 Expression SUMOylierter Proteine in *E. coli***

SUMOylierung und DeSUMOylierung von Proteinen ist ein sehr dynamischer Prozess in eukaryotischen Zellen. Um für biochemische Studien ausreichend SUMO-modifiziertes Substrat herzustellen, wurde ein Protokoll von Mencía und de Lorenzo verwendet (Mencia und de Lorenzo, 2004). Mit dem von ihnen beschriebenen System lässt sich SUMO-1 *in vivo* in *E. coli* spezifisch an Proteine konjugieren. Dafür müssen in den Bakterien ausreichende Mengen der SUMOylierungsmaschinerie zur Verfügung stehen. Diese wird auf den Plasmiden pKRSUMO (SUMO-1) bzw. pBADE12 (His-Aos1-Ubc9-Uba2, polycistronisch) kodiert. pKRSUMO vermittelt den Bakterien zusätzlich Kanamycin-Resistenz und pBADE12 Chloramphenicol-Resistenz. Das zu SUMOylierende Plasmid war in der Regel ein pGEX-Plasmid. Kolonien, die nun auf Ampicillin/Kanamycin/Chloramphenicol-haltigen Platten wuchsen, enthielten sowohl die SUMOylierungsmaschinerie als auch die entsprechenden Proteinsubstrate. Lysate dieser Bakterien enthalten dementsprechend eine Mischung aus unmodifiziertem und SUMO modifiziertem Substrat.

#### **2.2.3.8 Affinitätsreinigung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen**

Die Bakterienpellets der Proteinexpressionskulturen wurden mit 20 ml Lysepuffer aufgeschlossen.

#### **Lysepuffer**

1% Triton X-100  
1 mM DTT  
1 mg/ml Lysozym  
1 U Benzonase  
1 Tablette Proteasen-Inhibitoren-Cocktail  
in 50 ml PBS

Alternativ dazu erfolgte der Aufschluss mit „BugBuster-Reagenz“ nach den Angaben des Herstellers.

Die Lyse erfolgte bis die trübe Zellsuspension klar wurde. Die Lysate wurden für 10-30 sec sonifiziert und anschließend zentrifugiert (9500 rpm, 20 min, 4°C).

Die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen erfolgte mit „Glutathione Sepharose 4B“ in Chromatographiesäulen („Disposable Columns, 5 ml“) nach Angaben des Herstellers.

#### **2.2.3.9 Enzymatische Spaltung von Glutathion-S-Transferase Fusionsproteinen mittels Thrombin Protease**

Der N-terminal gelegene GST-Anteil der Fusionsproteine wurde mit Thrombin Protease in PBS geschnitten. Die Reaktion erfolgte für 0,5 h - 22 h bei 4°C oder 25°C. Die Thrombin Protease wurde auf 1 U/μl mit PBS verdünnt. Zum Entfernen der Thrombin Protease aus dem Reaktionsansatz wurde „Benzamidine Sepharose 6B“ nach den Angaben des Herstellers benutzt. Abgespaltene GST-Moleküle wurden mit „Glutathione Sepharose 4B“ aus der Lösung entfernt.

#### **2.2.3.10 Affinitätsreinigung von His-Fusionsproteinen**

Der Aufschluß der Bakterienpellets der Proteinexpressionskulturen erfolgte wie unter 2.2.3.8 für Glutathion-S-Transferase Fusionsproteine beschrieben.

Die Reinigung von His-Fusionsproteinen aus *E. coli* Lysaten erfolgte mit „Nickel Sepharose High Performance“ nach den Angaben des „QIAexpressionist Handbuchs“ (Qiagen, 2001). Für die vorliegende Arbeit wurde dabei ausschließlich unter nativen Bedingungen gearbeitet.

##### **Lysepuffer**

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300 mM NaCl  
10 mM Imidazol  
pH 8 mit NaOH

##### **Waschpuffer**

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300 mM NaCl  
20 mM Imidazol  
pH 8 mit NaOH

##### **Elutionspuffer**

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300 mM NaCl  
250 mM Imidazol  
pH 8 mit NaOH

#### **2.2.3.11 Dialyse von Proteinlösungen**

Die eluierten Proteine wurden in Dialyseschläuche gefüllt und mit Klammern an den Enden verschlossen. Die Dialyse erfolgte über Nacht mit häufigem Pufferwechsel.

##### **Dialysepuffer**

50 mM Tris•Cl (pH8,0)  
0,5 mM EGTA  
10% Glycerol  
100 mM Kaliumacetat  
2 mM Magnesiumacetat

#### **2.2.3.12 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Mikrotiterplattenformat)**

Die Quantifizierung von Proteinen wurde im 96-well Format durchgeführt. Dazu wurden je 5 µl BSA-Standardlösungen verschiedener Konzentration (0,1; 0,5; 1,0 und 1,6 µg/µl BSA) und 5 µl Probe unbekannter Konzentration in die Vertiefungen vorgelegt. Die Vertiefungen wurden anschließend mit jeweils 250 µl Bradford-Reagenz versetzt und nach 15 min Inkubationszeit bei RT die OD bei 595 nm in einem „Molecular Devices Spectra Max 250“ Mikrotiterplattenlesegerät bestimmt. Anhand der linearen Eichgeraden wurde die Proteinkonzentration der unbekannten Probe bestimmt.

#### **2.2.3.13 Expression von Proteinen im zellfreien System (Reticulozyten)**

Die Expression von Proteinen im zellfreien System wurde mit dem „TnT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System“ nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### **2.2.3.14 GST-Bindungsstudien**

In GST-Bindungsstudien kann eine Interaktion zwischen einem GST-Fusionsprotein und einem anderen Protein untersucht werden (Ausubel *et al.*, 2005). Unterschiedliche Mengen GST-Proteine werden dabei wie beschrieben an Glutathion-Sepharose gebunden (siehe Kap. 2.2.3.8). Diese gebundenen Fusionsproteine werden in der Regel mit *in vitro* translatierten und <sup>35</sup>S-radioaktiv markierten Proteinen inkubiert (siehe Kap. 2.2.3.13). Anschließend werden nicht-spezifische Bindungspartner durch häufiges Waschen entfernt und gebundene Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Autoradiographie können dann die gebundenen radioaktiv markierten Proteine sichtbar gemacht werden.

#### **2.2.3.15 *In vitro* Phosphorylierung mit Erk1 Kinase**

Rekombinantes Erk1 wurde kommerziell erworben. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

0,83  $\mu$ l/ml Erk1  
5  $\mu$ g Substratprotein  
5  $\mu$ l  $\gamma$ -ATP (50  $\mu$ Ci  $^{32}$ P  $\gamma$ -ATP)  
mit Kinasepuffer auf 50  $\mu$ l auffüllen

Inkubation für 20 min bei 30°C.

**Enzym Verdünnungspuffer**

20 mM Tris•Cl (pH7,5)  
10 % Glycerol  
0,05 % Triton X-100  
0,1 mg/ml BSA  
2 mM DTT

**Kinasepuffer**

50 mM Tris•Cl (pH7,5)  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM EGTA  
2 mM DTT  
0,01% Triton X-100

**2.2.3.16 *In vitro* Methylierung mit immunopräzipitiertem G9a**

pCMV-GFP-G9a bzw. pCMV-GFP-G9a  $\Delta$ SET wurden transient in HEK-293 transfiziert, die Zellen nach 48 h geerntet und lysiert. Die GFP-Fusionsproteine wurden mit einem anti-GFP-Antikörper für 3 h immunopräzipitiert und direkt in die Methylierungsreaktion eingesetzt. Pro Reaktion wurde 1  $\mu$ Ci S-Adenosyl-L-[methyl- $^3$ H]-methionin zur Markierung von Substratproteinen in die Reaktion eingesetzt. Als Substrat wurden 1-5  $\mu$ g Substratprotein eingesetzt. Die Reaktion erfolgte für 3 h bei 30°C in Reaktionspuffer (Chin *et al.*, 2005).

**Lysepuffer**

50 mM Tris•Cl (pH8)  
150 mM NaCl  
0,1 % NP40  
1 mM EDTA  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
50  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>  
1 Tablette Proteasen-Inhibitoren-Cocktail

**Reaktionspuffer**

50 mM Tris•Cl (pH9)  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
4 mM DTT

**2.2.3.17 *In vitro* SUMOylierung**

Für die *in vitro* SUMOylierung wurden folgende Komponenten gemischt und die Reaktion für 1 h bei 30°C durchgeführt:

1-5 µg Substratprotein  
 5 µg GST-PIAS  
 1 µg Ubc9  
 10 µg Uba2/Aos1  
 5 µg SUMO-1-GG  
 5 mM ATP  
 1 Tablette Proteasen-Inhibitoren-Cocktail  
 ME-Puffer

#### 10x ME-Puffer

500 mM Tris•Cl (pH7,3)  
 1100 mM Kaliumacetat  
 20 mM Magnesiumacetat  
 5 mM EGTA  
 10 mM DTT  
 0,5 % Tween 20  
 2 mg/ml Albumin (BSA)

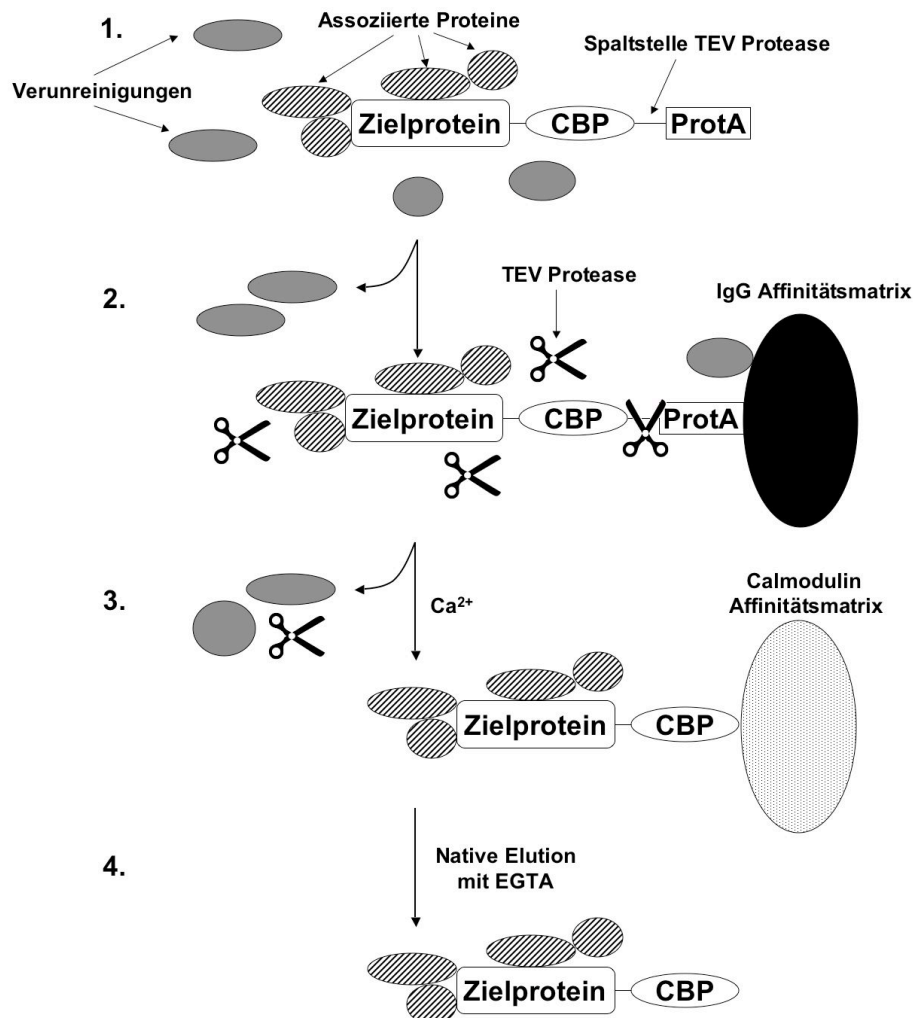
#### 2.2.3.18 Tandem affinity purification

Die tandem affinity purification (TAP) wurde zur Reinigung von Proteinkomplexen unbekannter Komposition, Aktivität oder Funktion entwickelt (Rigaut *et al.*, 1999). Unter Verwendung von massenspektrometrischen Untersuchungen können so Proteinkomponenten identifiziert werden, die mit einem bestimmten Zielprotein assoziiert sind. Die TAP-Technologie kombiniert zwei Affinitätsreinigungsschritte unter nativen Pufferbedingungen und erreicht so eine effiziente und spezifische Reinigung. Das TAP-tag besteht aus zwei IgG-Bindungsdomänen von Protein A aus *Staphylococcus aureus* (ProtA) und dem calmodulin-binding peptide (CBP). Das CBP bindet reversibel an Calmodulin in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ . Eine Elution von Calmodulin ist deshalb unter milden Bedingungen unter Verwendung von Komplexbildnern möglich. Im Gegensatz dazu eluiert ProtA von matrix-gebundenen IgG nur unter sauren Bedingungen. Zur Abspaltung der Proteinkomplexe von der IgG-Matrix befindet sich eine Spaltsequenz für die „tobacco etch virus“ Protease (TEV Protease) zwischen CBP und ProtA. Das TAP-tag wird C- oder N-terminal an das Zielprotein fusioniert und in geeignete Zellen eingebracht. Die Methode wurde ursprünglich für Hefen entwickelt und dort erfolgreich zur Identifikation von unbekannten Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt (Rigaut *et al.*, 1999; Puig *et al.*, 2001). TAP-tags wurden jedoch auch für die Isolation von Proteinkomplexen aus höheren Eukaryoten verwendet (Cox *et al.*, 2002). Bei einer Überexpression von Fusionsproteinen kann es zu unphysiologischer Proteinkomplexbildung kommen. Deshalb wird versucht, eine Expression auf möglichst endogenem Niveau zu erreichen. In Hefen wird dies durch homologe Rekombination und Expression des Fusionsproteins von seinem normalen Lokus erreicht. In Säugerzellen wird das Konstrukt idealerweise durch retrovirale Integration in das Genom eingebracht. Die Expression erfolgt dort unter Verwendung eines schwachen viralen Promotors. Das Fusionsprotein und assoziierte Proteinkomponenten werden in einem ersten Schritt aus dem Zellextrakt isoliert und durch Affinitätschromatographie an einer IgG-Matrix gebunden. Nach gründlichem Waschen erfolgt die Zugabe von TEV Protease in einem nativen Puffer um gebundene Komplexe abzuspalten. Das Eluat wird nachfolgend mit Calmodulin-gebundener Matrix inkubiert um die TEV Protease und andere Verunreinigungen zu entfernen. Nach einem erneuten Waschschritt können gebundene Komplexe mit EGTA-haltigem Puffer eluiert werden. Die Auftrennung der Komplexe erfolgt mittels eindimensionaler SDS-PAGE. Die Proteinbanden können durch Silberfärbung sichtbar gemacht werden, aus dem Gel isoliert und massenspektrometrisch analysiert werden.



Calmodulin binding peptide (CBP)  
 NH<sub>2</sub>-SME**KRRWKKNF****IAVSAANRFKKISSSGAL**DYDIPTTAS**ENLYFQ**ELKTAALAQHDEA  
 TEV Spaltstelle  
 ↓  
 Protein A IgG-Bindungsdomäne  
**VDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK**  
 Protein A IgG-Bindungsdomäne  
**VDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK**  
 VDANSAGKST-COOH

**Abb. 2.1: Aminosäuresequenz des TAP-tags.** Dargestellt ist die Peptidsequenz des TAP-tags vom N-terminalen Bereich aus. CBP- und ProtA-Interaktionsdomänen sind fett dargestellt, die TEV Proteasesequenz ist fett und unterstrichen dargestellt. Das dargestellte Peptid ist für C-terminale Fusionen geeignet.



**Abb. 2.2: Reinigungsschema der TAP-Methode (modifiziert nach Rigaut *et al.*, 1999).** Dargestellt sind die vier Arbeitsschritte der TAP-Methode. 1) Das Zielprotein liegt mit einem C-terminalen TAP-tag in Zellen vor und ist mit anderen Proteinen komplexiert. Das TAP-Epitop besteht aus einem calmodulin binding peptide (CBP), einer Schnittstelle für die TEV Protease und zwei IgG-Bindungsdomänen von ProtA. 2) In einem ersten Affinitätsschritt wird

das TAP-Fusionsprotein an eine IgG Affinitätsmatrix gebunden und Verunreinigungen entfernt. Die Elution erfolgt mit TEV-Protease. 3) Im zweiten Affinitätsschritt wird das CBP-Fusionprotein in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$  an eine Calmodulin-Matrix gebunden. Die TEV-Protease und Fremdproteine werden ausgewaschen. 4) TAP-Fusionsproteine und assoziierte Komplexpartner können mit EGTA von der Säule eluiert und identifiziert werden.

Als Ausgangsmaterial für die Aufreinigung dienten  $1 \times 10^8$  bis  $1 \times 10^9$  Zellen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und bei 2000 rpm für 15 min bei 4°C pelletiert. Das PBS wird entfernt und das Gesamtzellvolumen bestimmt. Dies diente bei den Aufreinigungsschritten als Richtwert für die verwendeten Puffermengen. Zu den Zellen wurden 5 Volumina hypotonischer Puffer pipettiert und die Zellen für 3-5 min auf Eis quellen gelassen. Danach wurden die Zellen mit einem Douncer aufgeschlossen und die Zellkerne pelletiert (5 min, 14.000 rpm, 4°C). Die Zellkerne wurden in 1-2 Gesamtzellvolumina hypertonischem Puffer aufgenommen und 20 min auf Eis inkubiert. Die Kerne wurden durch erneutes „douncen“ aufgeschlossen und durch Zentrifugation (30 min, 14.000 rpm, 4°C) in Nukleoplasma und unlösliche Kernbestandteile fraktioniert. Für die Bindung an die IgG-Affinitätsmatrix wurde das Nukleoplasma mit IgG Verdünnungspuffer auf optimale Bedingungen eingestellt.

Die IgG-Matrix wurde mit 2-3 Säulenvolumen der folgenden Lösungen äquilibriert:

- 1) 0,5 M Essigsäure (pH3,4) (eingestellt mit Ammoniumacetat)
- 2) TST (50 mM Tris•Cl (pH7,6); 150 mM NaCl; 0,05% Tween 20)
- 3) 0.5 M Essigsäure (pH3,4)
- 4) TST
- 5) IgG Waschpuffer

Das verdünnte Nukleoplasma wurde nun für mindestens eine Stunde an die equilibrierte IgG-Affinitätssäule gebunden. Nach dem Binden wurde das Säulenmaterial mit IgG Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde zweimal mit TEV Proteasepuffer gewaschen. Für die proteolytische Reaktion wurden pro 90 µl IgG-Matrixvolumen je 400 µl TEV Proteasepuffer und 10 µl (100 U) TEV Enzym hinzugegeben und für 1-12 h bei 4°C gespalten. Das Eluat enthält nun das CBP-Fusionsprotein, der ProtA-Teil des Proteins bleibt an der Säule gebunden. Die geschnittene IgG-Matrix wurde mit 2x100 µl TEV Proteasepuffer ausgewaschen und mit der Elutionsfraktion vereinigt. Das Eluat wurde auf die optimalen Pufferkonditionen für die Bindung an die Calmodulin-Säule mit Imidazol und 2-Mercaptoethanol eingestellt (Endkonzentration 10 mM 2-Mercaptoethanol und 0,7 mM Imidazol).

Die Calmodulin-Matrix wurde vor der Verwendung mit Calmodulin Bindungspuffer äquilibriert. Das durch die TEV Protease abgespaltene Protein wurde für mindestens 1 h an die Calmodulin-Säule gebunden. Es folgten drei Waschschrte mit Calmodulin Bindungspuffer. Die Elution von der Calmodulin-Säule wurde mit Calmodulin Elutionspuffer erreicht. Die eluierten Proteine wurden in Probenpuffer aufgenommen und durch eindimensionale SDS-PAGE getrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Silberfärbung des Gels (Ausubel *et al.*, 2005).

#### **Hypotonischer Puffer**

10 mM Tris•Cl (pH8,0)  
 10 mM NaCl  
 0,1 mM EDTA (pH8,0)  
 1 mM DTT  
 Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (1 Tablette)

#### **Hypertonischer Puffer**

20 mM Tris•Cl (pH8,0)

300 mM NaCl  
0,2 mM EDTA (pH8,0)  
1 mM DTT  
Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (1 Tablette)  
1,5 mM Magnesiumacetat  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
20% Glycerol  
0,1% NP-40

**IgG Waschpuffer**

10 mM Tris•Cl (pH8,0)  
150 mM NaCl  
0,5 mM EDTA (pH8,0)  
0,5 mM DTT  
Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (1 Tablette)  
0,7 mM Magnesiumacetat  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
20% Glycerol  
0,1% NP-40

**IgG Verdünnungspuffer**

10 mM Tris•Cl (pH8,0)  
150 mM NaCl  
0,8 mM EDTA (pH8,0)  
0,5 mM DTT  
Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (1 Tablette)  
0,7 mM Magnesiumacetat  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
20% Glycerol  
0,1% NP-40

**TEV Proteasepuffer**

10 mM Tris•Cl (pH8,0)  
150 mM NaCl  
0,5 mM EDTA (pH8,0)  
1 mM DTT  
Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (1 Tablette)  
0,7 mM Magnesiumacetat  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
10% Glycerol  
0,1% NP-40

**Calmodulin Bindungspuffer**

10 mM Tris•Cl (pH8,0)  
150 mM NaCl  
10 mM 2-Mercaptoethanol  
0,7 mM Magnesiumacetat  
0,7 mM Imidazol  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
20% Glycerol  
0,1% NP-40

**Calmodulin Elutionspuffer**

10 mM Tris•Cl (pH8,0)  
150 mM NaCl

10 mM 2-Mercaptoethanol  
 0,7 mM Magnesiumacetat  
 0,7 mM Imidazol  
 20% Glycerol  
 0,1% NP-40  
 2 mM EDTA (pH8,0)  
 2 mM EGTA (pH8,0)

## 2.2.4 Identifikation von Interaktionspartnern auf RZPD Protein-Macroarrays

Für die proteom-weite Identifikation von Interaktionspartnern wurden RZPD Protein-Macroarrays verwendet. Als Proteinsonden wurden durch *in vitro* Phosphorylierung radioaktiv markierte PKA-C/EBP $\beta$ -Fusionsproteine verwendet. Nach dem Inkubationsschritt erfolgte die Detektion gebundener Proteine mittels Autoradiographie. Die Identifikation der gefundenen Klone erfolgte im Anschluß daran über Datenbankanalysen. Eine detailliertere Beschreibung der Arbeitsschritte erfolgt im Ergebnisteil (siehe Kap. 3.2).

### 2.2.4.1 Herstellung einer radioaktiv markierten Proteinsonde

#### Herstellung von Proteinkinase A Lösung

1  $\mu$ g lyophilisierte Proteinkinase A wurde in 20  $\mu$ l 6 mg/ml DTT in H<sub>2</sub>O gelöst (38,8  $\mu$ l 1M DTT in 1 ml H<sub>2</sub>O). Da lyophilisiertes Material nur 0,09 % aktives Protein enthält, wurden 1,1 mg lyophilisiertes Material in 20  $\mu$ l 6 mg/ml DTT in H<sub>2</sub>O gelöst (Endkonzentration 0,05 mg/ml Protein). Die Proteinlösung wurde vor Benutzung 10 min bei RT inkubiert.

#### *In vitro* Phosphorylierung mittels Proteinkinase A

Die direkte Phosphorylierung von C/EBP $\beta$  (LAP Isoform) mittels PKA wurde bereits beschrieben (Trautwein *et al.*, 1994). Dieses Protokoll wurde für die *in vitro* Phosphorylierung der PKA-C/EBP $\beta$ -Fusionsproteine in leicht modifizierter Form angewendet.

5  $\mu$ l PKA  
 5  $\mu$ g PKA-Akzeptor-Fusionsprotein  
 5  $\mu$ l  $\gamma$ -ATP (50  $\mu$ Ci  $^{32}$ P  $\gamma$ -ATP)  
 mit Kinasepuffer auf 50  $\mu$ l auffüllen

Inkubation für 20 min bei 30°C.

#### Kinasepuffer

10 mM MgCl<sub>2</sub>  
 20 mM MES  
 2 mM EGTA  
 1 mM EDTA

#### Abtrennung freier $^{32}$ P $\gamma$ -ATP Moleküle

Der gesamte Reaktionsansatz wurde auf eine zentrifugierbare „Microcon YM-10“ Filtersäule mit einer Ausschlußgröße von 10 kD pipettiert und 50  $\mu$ l Kinasepuffer hin-

zugegeben. Die Säule wurde 10 min bei 14000xg zentrifugiert und erneut 50 µl Kinasepuffer hinzugegeben. Nach zwei weiteren Zentrifugationsschritten wurde das Filtrat in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die inkorporierte Menge an Radioaktivität wurde mit einem Beckman LS6000LL Flüssig-Szintillationszähler gemessen und die Qualität der Sonde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt (siehe Abb. 3.7). Die gereinigten Proteinsonden wurden in 50 ml Blocklösung (siehe 2.2.4.2) aufgenommen.

#### **2.2.4.2 Hybridisierung der RZPD Protein-Macroarray PVDF-Membran**

Die Protein-Macroarray Membranen wurden mit 96 % Alkohol bei RT gereinigt und anschließend wiederholt mit ddH<sub>2</sub>O abgespült. Die Membranen wurden mit TBS-T-T angefeuchtet und Reste der aufgetüpfelten Bakterienkolonien mit Papiertüchern vorsichtig abgewischt. Die überexprimierten His-getaggten Proteine waren zu diesem Zeitpunkt schon an die Membran gebunden. Die Macroarrays wurden zweimal 10 min bei RT mit TBS-T-T gewaschen. Anschließend wurden die Membranen wiederholt mit TBS abgespült und zweimal 10 min bei RT mit TBS gewaschen. Die Macroarrays wurden zwei Stunden bei RT in Blocklösung inkubiert. Die Hybridisierung der Membran mit der radioaktiv markierten Proteinsonde erfolgte über Nacht bei RT.

##### **TBS**

500 mM NaCl  
20 mM Tris•Cl (pH7,5)

##### **TBS-T (TBS + Tween)**

500 mM NaCl  
20 mM Tris•Cl (pH7,5)  
0.05% Tween 20

##### **TBS-T-T (TBS + Tween + Triton X-100)**

500 mM NaCl  
20 mM Tris•Cl (pH7,5)  
0.05 % Tween 20  
0.5 % Triton X-100

##### **Blocklösung**

3 % fettarmes Milchpulver in TBS-T (30 g/l, filtrieren)

#### **2.2.4.3 Detektion gebundener Proteine**

Die Hybridisierungslösung wurde verworfen und die Macroarrays viermal 10 min bei RT mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde zweimal 10 min mit TBS bei RT gewaschen. Die Membranen wurden nun auf Whatman Papier getrocknet, in Saran-Folie verpackt und bei -70°C exponiert.

#### 2.2.4.4 Identifikation von Interaktionspartnern

Die Auswertung der Autoradiogramme wurde nach den „Instructions for scoring high-density protein macroarrays 5x5 duplicate“ (RZPD Berlin, 2003) durchgeführt. Auf den 22 cm x 22 cm PVDF-Membranen sind Klone in Duplikaten in Blöcken zu je 5x5 Klonen aufgebracht worden. Bei einer erfolgreichen Hybridisierung müssen auf dem Autoradiogramm doppelte Punkte zu erkennen sein. Diese Doppelpunkte müssen einem der in Abb. 3.8 dargestellten 12 Muster entsprechen. Die absolute Position eines Punktes auf dem Filter ergibt sich dann nach der Formel:

$$x1 = 5(X-1) + x'$$

$$y1 = 5(Y-1) + y'$$

Die Position eines entsprechenden Duplikats ergibt sich nach der Formel:

$$x2 = 5(X-1) + x''$$

$$y2 = 5(Y-1) + y''$$

	<b>Legende</b>	<b>Beispiel</b>
	5x5 Punktmuster	5
<b>X; Y</b>	X Koordinate Y Koordinate <i>eines 5x5 Blocks</i>	X = 3 Y = 2
<b>x'; y'</b> <b>x''; y''</b>	x' Koordinatenpunkt y' Koordinatenpunkt x'' Koordinatenpunkt Duplikat y'' Koordinatenpunkt Duplikat <i>innerhalb eines 5x5 Blocks</i>	x' = 5 y' = 1 x'' = 4 y'' = 4
<b>x1; y1</b> <b>x2; y2</b>	x Koordinatenpunkt y Koordinatenpunkt x Koordinatenpunkt Duplikat y Koordinatenpunkt Duplikat <i>absolute Position auf dem Macroarray</i>	x1 = 5(3-1) + 5 = 15 y1 = 5(2-1) + 1 = 6 x2 = 5(3-1) + 4 = 14 y2 = 5(2-1) + 4 = 9

**Tab. 2.4: Anleitung zur Bestimmung der absoluten Position eines Klon auf dem RZPD Protein-Macroarray.**

Folgende Macroarrays wurden nach diesem Verfahren verwendet:

<b>Protein Array</b>	<b>Proteinsonde</b>
RZPD library no 829: Human Colon Protein Expression Library, 18432 Proteine/Array	PKA-hC/EBP $\beta$ CR 1-4
RZPD library no 828: Human Lung Protein Expression Library, 24576 Proteine/Array	PKA-hC/EBP $\beta$ CR 5-7
RZPD library no 828: Human Lung Protein Expression Library, 24576 Proteine/Array	PKA-hC/EBP $\beta$ CR567 SUMO-1

**Tab. 2.5: Übersicht über die verwendeten Protein-Macroarrays und die hybridisierten Proteinsonden.**

### 2.2.5 Reporterstudien

Für Luciferase-Reporterstudien wurde das Plasmid pM82 verwendet, welches über zwei invertierte C/EBP $\beta$  Bindungsstellen aus dem cMGF-Promoter verfügt (Sterneck *et al.*, 1992a; Sterneck *et al.*, 1992b). Optional dazu wurden Reportergenkonstrukte verwendet, bei denen die zwei C/EBP $\beta$ -Bindungsstellen gegen vier Gal4-Bindungsstellen ausgetauscht wurden (Kowenz-Leutz *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurden ein CSL-/RBP-J $\kappa$ -abhängige Hes-1 Reportergenkonstrukte verwendet (zur Verfügung gestellt von Ryoichiro Kageyama). Verschiedene Expressionsvektoren wurden zusammen mit Luciferase Reportergenkonstrukten in eukaryotische Zellen transfiziert. Die Reaktionsansätze wurden dabei stets auf gleiche DNA-Mengen mit pcDNA3 Plasmid aufgefüllt. Die Zellen wurden nach 36-48 h lysiert und die Lichteinheiten in Doppelwerten in einem Berthold Lumat LB9501 bestimmt. Zur Normalisierung der Lichteinheiten gegen die jeweilige Transfektionseffizienz wurden gleiche Mengen pCMV- $\beta$ -Galactosidase kotransfiziert, die gebildete Menge an  $\beta$ -Galactosidase gemessen und mit den relativen Lichteinheiten verrechnet.

#### Lysepuffer

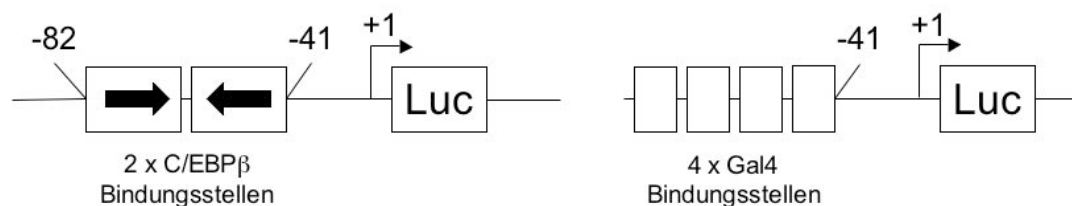
50 mM Tris•Cl (pH7,5)  
1 mM EDTA  
1 mM DTT  
1% Triton

#### Reaktionspuffer

9 ml Gly-Gly 25 mM  
1 ml ATP 20 mM (pH7,5)  
0,1 ml MgSO<sub>4</sub> 1M

#### Substratpuffer

4 ml Gly-Gly 25 mM  
1 ml Luciferin



**Abb. 2.3: Schematische Darstellung der pM82 Reportergenkonstrukte.** pM82 besitzt invertierte C/EBP $\beta$ -Bindungsstellen aus dem cMGF-Minimalpromotor. Optional wurden diese durch vier Gal4-Bindungsstellen ausgetauscht (modifiziert nach Kowenz-Leutz *et al.*, 1994).

## **2.2.6 Zellkultur**

### **2.2.6.1 Zelllinien**

Alle verwendeten Zelllinien wurden nach Angaben der ATCC ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)) kultiviert und passagiert. Als Standardmedien wurden folgende Lösungen verwendet:

DMEM mit 10% FCS, 1% P/S (für Cos-7, Hek-293, HeLa)

DMEM mit 8% FCS, 2% Chicken Serum, 1% P/S (für QT6)

RPMI mit 10% FCS, 1% P/S (für Jurkat und HL-60)

### **2.2.6.2 Transiente Transfektion**

Eukaryotische Zellen wurden transient nach der Calcium-Phosphat-Methode transfiziert (Ausubel *et al.*, 2005). Für spezielle Zelltypen wurden transiente Transfektionen mit dem „Metafectene Transfektionsreagenz“ für Säugerzellen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **2.2.6.3 Virale Infektionen**

Virale Infektionen wurden weitestgehend nach dem „Retroviral Gene Transfer and Expression Manual“ (Clontech, Protokoll-Nr. PT3132-1, Version-Nr. PR23868) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde ein pantropisches retrovirales Expressionssystem verwendet. Als Verpackungszelllinie wurde GP2-293 benutzt. Die Zellen wurden mit pZome bzw. pBabe-puro Konstrukten zusammen mit dem pVSV-G Vektor transfiziert.

## **2.2.7 Immunofluoreszenz**

Für die Immunofluoreszenz wurde eine unterschiedliche Anzahl von Zellen auf Glasplättchen ausgesät. Die Fixierung der Zellen für die Immunofluoreszenz erfolgte mit 4% Formaldehydlösung (Roth Histofix) für 10 min bei RT nach zweimaligem Waschen mit PBS. Die Zellen wurden danach mit 0,1%-0,5% Triton X-100 in PBS für 2-10 min permeabilisiert und erneut mit PBS gewaschen. Zur Blockierung nicht-spezifischer Bindungen wurde 1% BSA-Lösung in PBS für 30 min zu den Glasplättchen pipettiert und anschließend mit dem Primärantikörper in Blocklösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Primärantikörper wurde durch wiederholtes Waschen entfernt, die Inkubation mit Sekundärantikörper erfolgte für 1 h bei RT. Mit drei weiteren Waschschritten wurde ungebundene Antikörperlösung entfernt. Ein letzter Waschschriff mit ddH<sub>2</sub>O diente zur Entfernung von Salzen. Die Plättchen waren nun bereit zum Aufbringen auf Objektträger. Optional erfolgte eine Färbung der Kern-DNA mit 0,1-1 mg/ml DAPI für 1 min. Die Konzentrationen der Antikörper-Lösungen variierten je nach Art des benutzten Antikörpers.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 „Tandem affinity purification“ (TAP) zur Identifikation C/EBP $\beta$ -assoziierter Proteinkomplexe

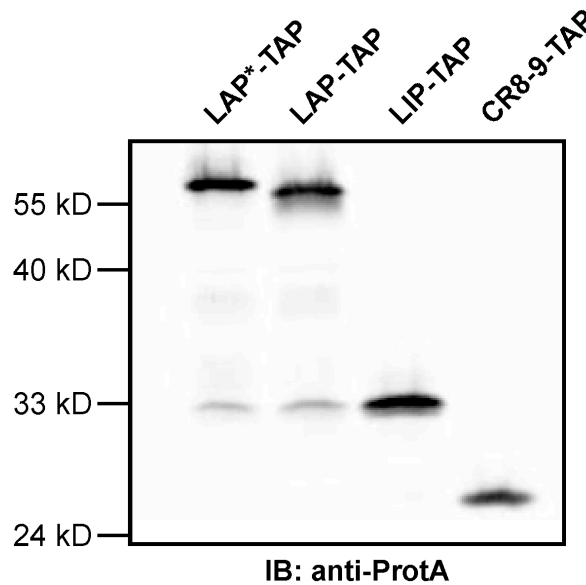
##### 3.1.1 Generierung von stabil exprimierenden C/EBP $\beta$ -TAP Zelllinien

Viele zelluläre Funktionen werden nicht durch einzelne Proteine, sondern vielmehr durch Proteinkomplexe ausgeführt. Die Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen ist deshalb in der post-genomischen Ära von entscheidender Bedeutung geworden, um die Bestandteile von Multiproteinkomplexen zu identifizieren.

Unter Verwendung der TAP-Methode sollten C/EBP $\beta$ -assozierte Proteinkomplexe isoliert und durch massenspektrometrische Untersuchungen identifiziert werden. Da die verschiedenen Isoformen von C/EBP $\beta$  unterschiedlich lange Bereiche des N-Terminus enthalten, sollte überprüft werden, ob die verschiedenen Isoformen unterschiedliche Proteinkomplexe binden. Dies würde Rückschlüsse auf eine spezifische biologische Funktion der verschiedenen Isoformen ermöglichen.

Die kodierenden Bereiche für die LAP\*, LAP und LIP Isoformen und die CR8-9 des human C/EBP $\beta$  Gens wurden mittels PCR amplifiziert und in den pZome-Vektor zur Generierung von C-terminalen TAP-Fusionsproteinen kloniert. Neben zwei endständigen IgG-Bindungsdomänen von Protein A aus *Staphylococcus aureus* (ProtA) besteht das TAP-tag aus einem calmodulin-binding peptide (CBP). ProtA und CBP sind durch eine spezifische Spaltstelle für die TEV Protease getrennt. Diese erlaubt die Abspaltung des ProtA-Anteils unter nativen Bedingungen.

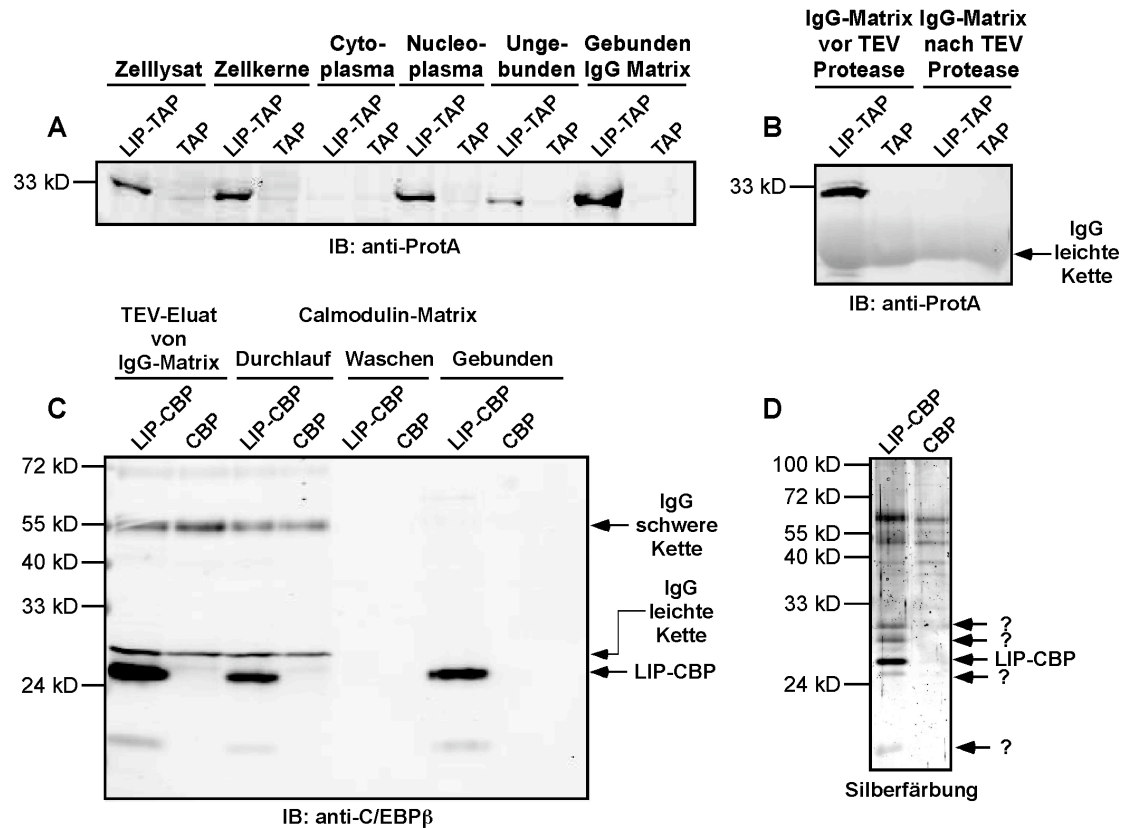
Für die Herstellung von Zelllinien, die stabil C/EBP $\beta$ -TAP Fusionsproteine exprimieren, wurden diese mit virushaltigem Zellkulturüberstand infiziert und anschließend selektioniert. Die pZome-Vektoren wurden in GP2-293 Zellen transfiziert, die virus-haltigen Zellüberstände nach 48 h geerntet und damit unterschiedliche Zelllinien infiziert. Aufgrund des Puromycin-Resistenzgens konnten die Zielzellen mit Puromycin selektioniert werden. Dadurch wurden verschiedene stabil exprimierende Zelllinien generiert (C33a, HEK-293, K562, C/EBP $\beta^{-/-}$  MEF). Exemplarisch ist in Abb. 3.1 die Expression der TAP-Fusionsproteine in K562-Zellen gezeigt. Das TAP-tag erhöht das Molekulargewicht der Proteine um 20 kD.



**Abb. 3.1: Expression der C/EBP $\beta$ -TAP Konstrukte in K562-Zellen.** K562-Zellen wurden mit LAP<sup>\*</sup>-, LAP-, LIP- und CR89-TAP Konstrukten infiziert und mit Puromycin für 10 Tage selektioniert. Von jeder Zelllinie wurden  $1 \times 10^5$  Zellen lysiert, die Lysate mit SDS-PAGE aufgetrennt und die Fusionsproteine mittels Immunoblot (anti-ProtA Antikörper) detektiert.

### 3.1.2 Reinigung von C/EBP $\beta$ -TAP Komplexen

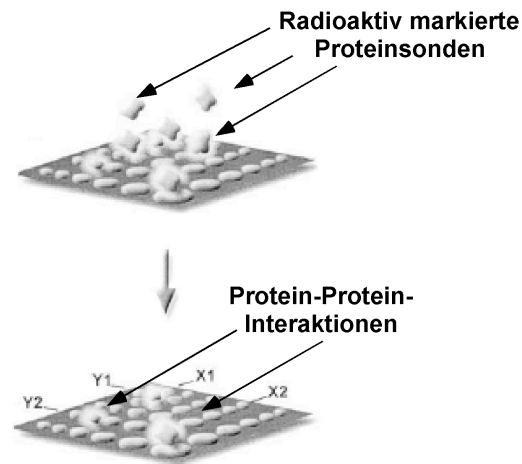
Abb. 3.2 zeigt beispielhaft die Aufreinigung von LIP-TAP aus K562-Zellen mittels „tandem affinity purification“. Die Zellen wurden mit Lysepuffer und nativen Bedingungen aufgeschlossen und in Cytoplasma und Nukleoplasma fraktioniert (siehe Kap. 2.2.3.18). Das Nukleoplasma enthielt den Hauptanteil von TAP-Fusionsprotein, im Cytoplasma konnte dieses nicht detektiert werden. Die Nukleoplasma-Fraktion wurde mit IgG-Agarose inkubiert und an die Affinitätssäule gebunden (Abb. 3.2 A). Durch Inkubation mit TEV Protease wurde LIP-CBP effizient von der Säule geschnitten (Abb. 3.2 B). Das Eluat von der IgG-Säule konnte in einem zweiten Affinitätsschritt an Calmodulin-Sepharose gebunden werden (Abb. 3.2 C). Nach der Elution mit EGTA-haltigem Puffer konnte LIP-CBP durch SDS-PAGE und nachfolgende Silberfärbung detektiert werden. Zusätzlich wurden spezifische Interaktionspartner auf dem Gel sichtbar (Abb. 3.2 D). Die Identifikation dieser assoziierten Proteine mit massenspektrometrischen Untersuchungen wurde in Kollaboration mit E. Müller und A. Otto (MDC, Berlin) durchgeführt. Es konnten jedoch keine spezifisch mit C/EBP $\beta$  assoziierten Proteine gefunden werden. Nach mehreren Versuchen stellte sich heraus, dass die Menge an Ausgangsmaterial dafür noch immer zu gering war. Es konnte zum Teil noch nicht einmal die Anwesenheit des C/EBP $\beta$ -CBP Proteins nach Durchführung der TAP-Affinitätsreinigung nachgewiesen werden. Die Sensitivität des Massenspektrometers war demnach zu gering, da C/EBP $\beta$ -CBP Proteine durch Immunoblot und Detektion mit anti-C/EBP $\beta$ -spezifischem Antikörper nach dem letzten Elutionsschritt nachgewiesen werden konnten. Eine Erhöhung der Menge an Ausgangsmaterial über  $10^9$  Zellen hinaus konnte nicht erreicht werden, da die veränderten Wachstumsbedingungen zur Kultivierung dieser großen Zellmengen zu einem Absterben der Zellen führten. Alles in allem stellte sich heraus, dass die TAP-Methode in Verbindung mit den verwendeten Massenspektrometern zu ineffizient war, um C/EBP $\beta$ -assoziierte Proteinkomplexe aufzureinigen.



**Abb. 3.2: Reinigung der C/EBPβ LIP-TAP Isoform und assoziierter Proteine aus K562-Zellen.** (A) Aufschluss und Fraktionierung der Zellen und Bindung an die IgG-Affinitätssäule. Als Ausgangsmaterial dienten  $1 \times 10^9$  Zellen. (B) IgG-Affinitätsmatrix vor und nach der proteolytischen Spaltung mit TEV Protease. (C) Elution von der IgG-Affinitätsmatrix und Bindung an die Calmodulin-Säule. (D) Elutionsfraktionen von der Calmodulin-Affinitätsmatrix. Die Fragezeichen (?) markieren putative Interaktionspartner.

### 3.2 Hybridisierung von Protein-Microarrays zur Identifikation von Bindungspartnern

Da die Verwendung der TAP-Methode nicht zur Identifikation von Interaktionspartnern von C/EBPβ führte, wurde eine andere Strategie gewählt um dieses Ziel zu erreichen. Es wurde versucht, interagierende Proteine von C/EBPβ auf genomischen Protein-Microarrays zu identifizieren (Mahlknecht *et al.*, 2001). Dies geschah in einem „Far-Western“ oder auch „West-Western“ Ansatz, bei dem eine Proteinsonde dazu benutzt wurde, cDNA-Sequenzen von exprimierten Proteinen zu isolieren und zu identifizieren. Abb. 3.3 zeigt schematisch die Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen mit dieser Methode.



**Abb. 3.3: Schematische Darstellung der „Far-Western“ Methode zur Identifikation interagierender Proteine (modifiziert nach Mahlknecht et al., 2001).** Eine Membran mit aufgespotteten Proteinen wurde mit einer radioaktiven Proteinsonde inkubiert. Interagierende Proteine konnten direkt mittels Autoradiographie nachgewiesen werden.

Die Protein-Macroarrays wurden aus cDNA-Bibliotheken generiert, die im Labor von Hans Lehrach im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, hergestellt wurden (Bussow *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 1999). Sie wurden über das Referenzzentrum des Deutschen Humanen Genomprojektes (RZPD) bezogen. Die Protein-Macroarrays bestehen aus bis zu 27648 Proteinen, die in Duplikaten nach einem definierten Muster auf eine 22 x 22 cm PVDF-Membran aufgebracht wurden (maximal 55296 Proteinspots). Die Proteine wurden von dem prokaryotischen Expressionsvektor pQE exprimiert, welcher vollständige wie auch verkürzte cDNAs aus einem bestimmten Gewebe enthielt. Die Orientierung der Klone ist nicht in jedem Fall korrekt, theoretisch hat nur einer von sechs Klonen das richtige Leseraster. Der pQE-Vektor enthielt eine sechsfache Histidin-Sequenz, die N-terminal an die exprimierten Proteine fusioniert wurde. Zusätzlich enthielt der Vektor einen T5-Promotor und zwei „lac operator“ Sequenzen, welche die Repression während der Wachstumsphase durch Überexpression des Lac Repressorproteins ermöglichten. Die nachfolgende Induktion der Proteinexpression wurde durch Zugabe von Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG) ermöglicht. Vor dem Auftüpfeln wurden die Klone auf ihre Expression hin überprüft. Hierfür wurden Immunoblots mit einem anti-His-Antikörper durchgeführt. Alle Klone, welche His-getaggtetes Fusionsprotein exprimierten, konnten so identifiziert und systematisch auf eine PVDF-Membran aufgebracht werden.

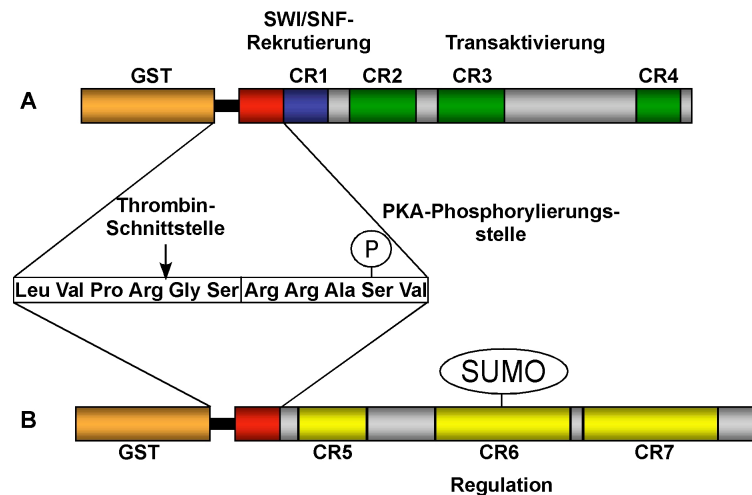
Die Identifikation von Interaktionspartnern wurde durch Inkubation des Protein-Macroarrays mit einer radioaktiv markierten Proteinsonde erreicht. Die Detektion von interagierenden Proteinen erfolgte mittels Autoradiographie. Da die Proteine in Duplikaten nach einem bestimmten Schema auf die PVDF-Membran aufgebracht wurden, müssen interagierende Proteine immer ein charakteristisches 2-Punkt-Muster zeigen.

Ziel der Studie sollte einerseits die Identifikation von Interaktionspartnern der transaktivierenden Region (CR1-4) von C/EBP $\beta$  sein. Andererseits sollten Interaktionspartner der regulatorischen Region (CR567) in ihrer SUMOylierten und nicht-modifizierten Form gefunden werden.

Für die Herstellung dieser Proteinsonde wurden Regionen von C/EBP $\beta$ , für welche neue Interaktionspartner ermittelt werden sollten, in den Vektor pGEX-2TK kloniert. Neben einem Glutathion-S-Transferase-Anteil (GST) kodiert dieser Vektor für eine Thrombin-Schnittstelle und eine PKA-Phosphoakzeptorsequenz. Die Thrombin-Spaltstelle ermöglicht die proteolytische Abspaltung des GST-Anteils. Die PKA-

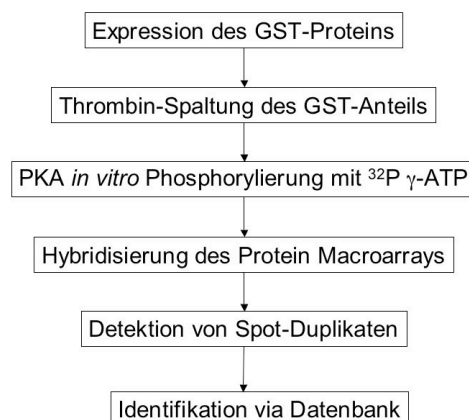
Phosphoakzeptorsequenz ermöglicht eine effiziente *in vitro* Phosphorylierung mit  $^{32}\text{P}$   $\gamma$ -ATP.

Es wurden zwei pGEX-2TK-Konstrukte hergestellt. Das erste enthielt die konservierten Regionen 1-4 des humanen C/EBP $\beta$  Proteins, also den gesamten N-terminus, welcher transaktivierende Eigenschaften besitzt (transaktivierende Domäne, TAD). Desweiteren wurde ein Konstrukt mit der regulatorischen Region von humanem C/EBP $\beta$  hergestellt, welches die konservierten Regionen 5-7 enthielt (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4: Schematische Darstellung der GST-PKA-C/EBP $\beta$  Fusionsproteine.** (A) Die N-terminal gelegene Region (orange) zeigt den GST-Anteil des Proteins. Der schwarze Balken enthält die Thrombinschnittstelle und die rote Region enthält die PKA-Phosphoakzeptorsequenz. Die Thrombin Protease hydrolysiert die Bindung zwischen Arginin und Glycin. PKA phosphoryliert spezifisch das Serin in der Phosphoakzeptorsequenz. Blaue, grüne und graue Teile bilden die transaktivierende Region von C/EBP $\beta$  (CR1-4). Durch CR1 kann der SWI/SNF-Komplex zur Remodellierung von Chromatin rekrutiert werden (Kowenz-Leutz und Leutz, 1999). Grüne Bereiche zeigen Abschnitte mit einem hohen Grad an Konservierung zwischen verschiedenen Spezies und anderen Mitgliedern der C/EBP $\beta$ -Familie. Graue Bereiche sind weniger stark konserviert. (B) Wie (A), nur das graue und gelbe Bereiche die regulatorische Region von C/EBP $\beta$  bilden (CR5, 6 und 7). CR6 enthält eine SUMO-Akzeptorsequenz. CR: „conserved region“, konservierte Region.

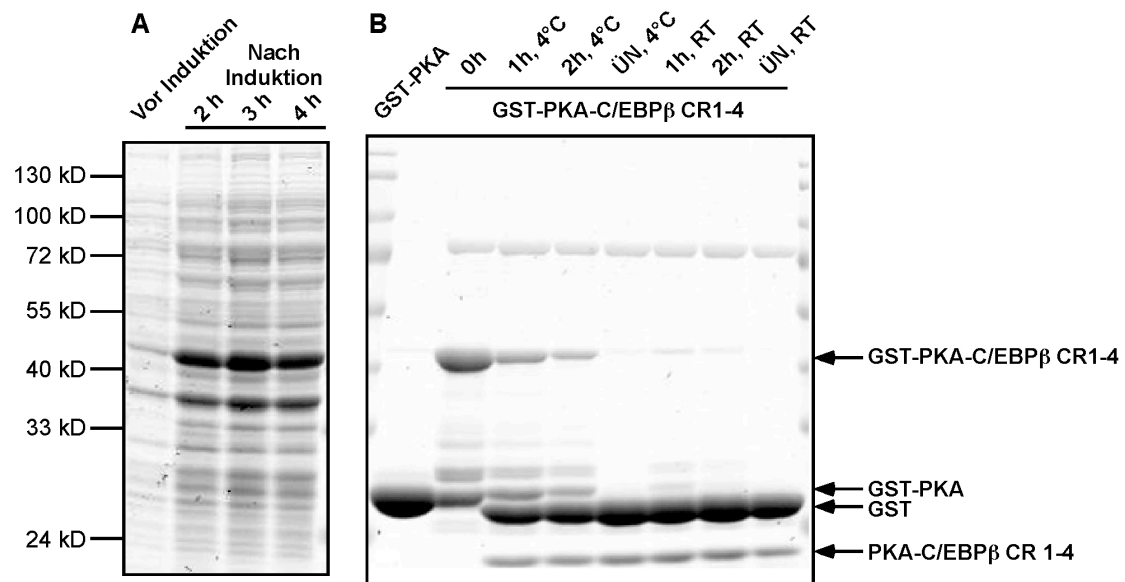
In der nachfolgenden Übersicht ist die Strategie zur Identifikation von Interaktionspartnern noch einmal schematisch dargestellt.



**Abb. 3.5: Strategie zur Identifikation von Interaktionspartnern.**

### 3.2.1 Generierung einer Proteinsonde aus der transaktivierenden Domäne (CR1-4) von C/EBP $\beta$

Zur Generierung einer Proteinsonde wurden die pGEX-2TK-Vektoren in *E. coli* BL21 transformiert und Einzelkolonien über Nacht bei 37°C in LB mit Ampicillin inkubiert. Die ersten vier Spuren des in Abb. 3.6 A dargestellten Coomassie-Gels zeigen die Expression des GST-PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 Fusionsproteins nach Induktion mit 1 mM IPTG nach zwei-, drei- und vierstündiger Inkubation. Bereits zwei Stunden nach IPTG-Induktion ist eine deutliche Expression des GST-Fusionsproteins zu erkennen. Abb. 3.6 B zeigt GST-PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 nach Thrombin-Verdau unter verschiedenen Bedingungen. Dabei wird deutlich, dass eine Spaltung des Fusionsproteins über Nacht bei RT nur die zwei erwarteten Spaltprodukte liefert und kein unspezifischer Verdau durch die Thrombin-Protease erfolgt. Unter diesen Bedingungen ist der Verdau nahezu vollständig, es liegt kein GST-Fusionsprotein mehr vor. Als Kontrolle wurde GST-PKA als Größenreferenz geladen (Abb. 3.6 B, Spur 1). Bei der Expression von GST-PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 ist auch etwas GST-PKA entstanden, vermutlich durch einen Abbruch der Translation.

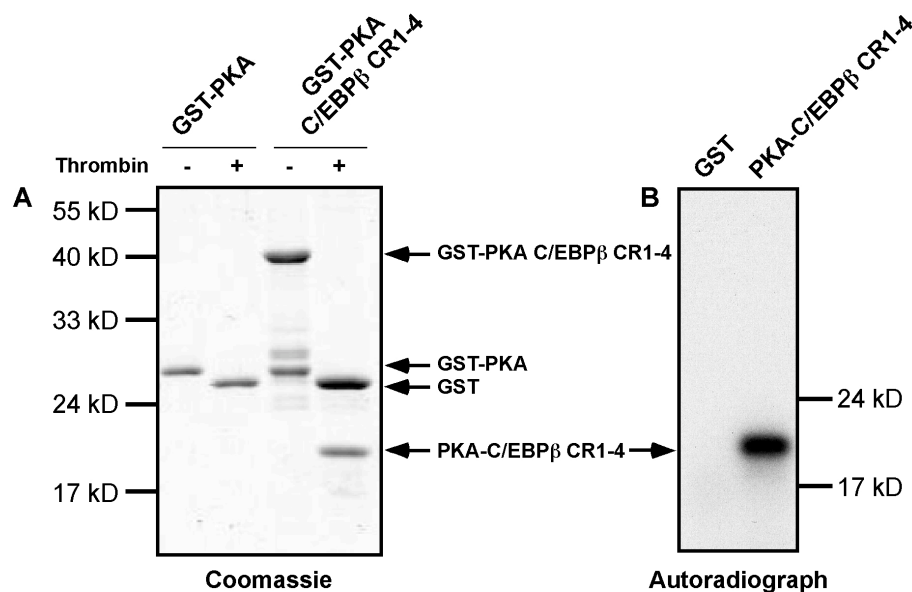


**Abb. 3.6: Expression und enzymatische Spaltung des GST-PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 Fusionsproteins mittels Thrombin.** (A) Für die Expressionskontrolle wurden Bakterien nach 2 h, 3 h und 4 h geerntet und wie in Kap. 2.2.3.6 beschrieben lysiert. 5  $\mu$ l des Lysats wurden auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung gefärbt. (B) Für die enzymatische Spaltung wurden jeweils 5  $\mu$ g GST-PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 mit 1/20 U Thrombin Protease bei 4°C oder bei RT inkubiert. Nach Inkubation für eine oder zwei Stunden bzw. über Nacht wurde ein Teil des Reaktionsansatzes entnommen, mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung gefärbt.

Für die Präparation der Proteinsonde in größerem Maßstab wurden 100  $\mu$ g GST-PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 Fusionsprotein und GST-PKA als Kontrolle unter den optimalen Reaktionsbedingungen mit Thrombin-Protease verdaut (Abb. 3.7). Nach der proteolytischen Spaltung wurde das Thrombin mit Benzamidin-Sepharose aus dem Reaktionsansatz entfernt. Die Entfernung von abgespaltenen GST-Molekülen erfolgte durch Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie. Die Elutionsfraktionen des letzten Chromatographieschrittes wurden mit SDS-PAGE analysiert und sind in Abb.

3.7 A dargestellt. Das eluierte PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 Fusionsprotein liegt in relativ reiner Form vor und kann im nachfolgenden Schritt mit PKA *in vitro* phosphoryliert und somit radioaktiv markiert werden. Die Abtrennung der GST-Moleküle war nicht vollständig, deshalb ist verbliebenes GST in der vierten Spur von Abb. 3.7 A zu erkennen. Es wurde jedoch nicht *in vitro* phosphoryliert und beeinträchtigt deshalb nicht die Qualität der Proteinsonde.

In der *in vitro* Phosphorylierungsreaktion wurden 5  $\mu$ g PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 und als Kontrolle der abgespaltene GST-Rest mit 50  $\mu$ Ci  $^{32}$ P  $\gamma$ -ATP und Proteinkinase A inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden nach der Reaktion abgetrennt. Die spezifische Phosphorylierung der Sonde wurde durch SDS-PAGE und nachfolgender Autoradiographie überprüft. PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 konnte spezifisch phosphoryliert werden stand nun für den Einsatz als Sonde auf dem Protein-Microarray zur Verfügung.



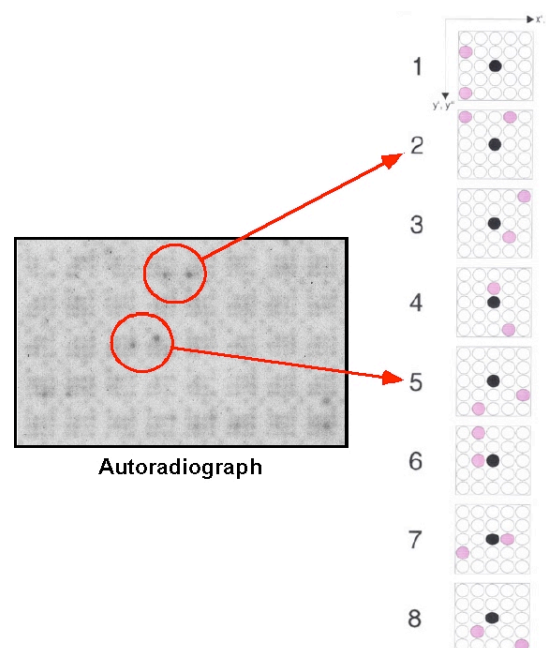
**Abb. 3.7: Thrombin-Spaltung, Affinitätsaufreinigung und *in vitro* Phosphorylierung des GST-PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 Fusionsproteins.** (A) Neben dem GST-PKA-C/EBP $\beta$  Fusionsprotein wurde GST-PKA als Referenz gespalten. Die Thrombinspaltung erfolgte über Nacht bei RT. Thrombin-Protease wurde durch Benzamidin-Sepharose Affinitätschromatographie aus dem Ansatz entfernt. Abgespaltene GST-Reste wurden durch Glutathion-Sepharose Affinitätschromatographie zum Teil aus der Lösung entfernt. Die Proteine wurden auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht. In der vierten Spur ist neben dem abgespaltenen GST-Anteil das PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 Fusionsprotein zu sehen. (B) *In vitro* Phosphorylierung des PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 Fusionsproteins mit PKA. 5  $\mu$ g abgespaltenes GST bzw. PKA-Fusionsprotein wurden in die Phosphorylierungsreaktion eingesetzt. 1/50 des Reaktionsansatzes wurde auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und radioaktiv markiertes Protein mittels Autoradiographie nachgewiesen.

### 3.2.2 Identifikation von Interaktionspartnern

Für die Hybridisierung wurde eine „RZPD Human Colon Protein Expression Library (no 829)“ verwendet. Auf dieser PVDF-Membran wurden 18432 mit einem N-terminalen His-Epitop versehene Fusionsproteine gespottet. Für die Hybridisierung wurden 5  $\mu$ g der radioaktiv markierten Proteinsonde PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 benutzt. Es wurden 223 Signale erkannt, die jeweils einem der acht aufgetragenen Muster ent-



sprachen. Abb. 3.8 zeigt schematisch einen Ausschnitt aus dem Protein-Macroarray und die Zuordnung zweier Hybridisierungssignale zu den jeweiligen Spotting-Mustern. 168 der 223 Signale konnten durch Sequenzvergleiche direkt einem Eintrag in der UniGene Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) zugeordnet werden. Viele der identifizierten Klone waren mehrfach auf der PVDF-Membran vertreten. Insgesamt konnten 122 nicht-redundante Interaktionspartner detektiert werden, welche in Tab. 3.1 im Anhang aufgeführt sind. Die Stärke der Hybridisierungssignale unterschied sich zum Teil recht deutlich für die einzelnen Kolonien. Auf eine Korrelation zwischen der Stabilität der Protein-Interaktion und der biologischen Relevanz kann jedoch nicht geschlossen werden (Mahlknecht et al., 2001). Die gefundenen Interaktionspartner wurden im Folgenden weiter untersucht.



**Abb. 3.8: Identifikation von Interaktionspartnern auf dem Protein-Macroarray.** Die Klone auf der PVDF-Membran sind nach einem der acht Muster in Doppelwerten aufgetragen worden. Bei einer positiven Interaktion werden deshalb beide Klone sichtbar. Abgebildet sind beispielhaft zwei Interaktionspartner, die nach dem Muster 2 bzw. 5 aufgespottet wurden. Der schwarze Punkt in der Mitte der 5x5-Quadrate dient als Referenzmarke zur Orientierung.

### 3.2.3 Auswahl von C/EBP $\beta$ Interaktionspartnern

Von den in Tab. 3.1 (Anhang) aufgeführten potentiellen Interaktionspartnern der Transaktivierungsregion von C/EBP $\beta$  wurde eine Auswahl von Proteinen getroffen, die für die biologische Funktionalität von C/EBP $\beta$  eine wichtige Rolle spielen könnten. Diese Proteine können einer der folgenden Klassen zugeteilt werden: Mitglieder der Polycomb-Familie, transkriptionelle Regulatoren, posttranslational modifizierende Enzyme und Moleküle in Signaltransduktionskaskaden. Tab. 3.2 zeigt eine Zusammenstellung dieser Proteine und die dazugehörige Proteinfamilie.



Nr.	Beschreibung nach UniGene Datenbank	Familie
39	Chromatin-modifying protein 1a	Polycomb
40	Chromobox homolog 2 (Pc class homolog, Drosophila) (CBX2)	Polycomb
68	Lethal(3)malignant brain tumor-like protein (L(3)MBT)	Polycomb
45	Egl nine homolog 1, SM-20	Posttranslationale Modifikation
47	F-box and WD-40 domain protein 5 (FBXW5), transcript variant 2	Posttranslationale Modifikation
59	Histone deacetylase 10 (HDAC10)	Posttranslationale Modifikation
60	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9 specific 3 (G9a)	Posttranslationale Modifikation
76	MRG-binding protein, Chromosome 20 open reading frame 20	Posttranslationale Modifikation
107	Serine/threonine-protein kinase Pim-3 oncogene (PIM3)	Posttranslationale Modifikation
14	Axin 1	Signaltransduktion
79	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila) (NOTCH1)	Signaltransduktion
80	Notch homolog 3 (Drosophila) (NOTCH3)	Signaltransduktion
16	Caudal type homeo box transcription factor 1 (CDX1)	Transkription
61	Homeobox protein Hox-A11	Transkription
81	Nuclear factor of activated T-cells, calcineurin-dependent 3 (NFATC3)	Transkription
82	Nuclear receptor co-repressor (NCOR)	Transkription
83	Nuclear receptor co-repressor 2 (NCOR2)	Transkription
98	Promyelocytic leukemia (PML)	Transkription
114	TIF1beta zinc finger protein	Transkription

**Tab. 3.2: Auswahl der Interaktionspartner der C/EBP $\beta$  TAD.** Insgesamt wurden 19 Interaktionspartner ausgewählt, welche bestimmten Proteinfamilien zugeordnet wurden (Polycomb Proteine, Posttranslationale Modifikatoren, Moleküle in Signaltransduktionswegen und Transkriptionelle Kofaktoren).

Im Fokus der nachfolgenden Experimente standen dabei die Korepressoren N-CoR und N-CoR2, die Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9 specific 3 (im Folgenden wird der Name G9a verwendet) und die Notch1 intrazelluläre Domäne (NICD).

Für das Repressormolekül N-CoR2 konnte bereits eine direkte Interaktion mit der C/EBP $\beta$  TAD gezeigt werden (Ki *et al.*, 2005). Die Überprüfung dieser Interaktion diene als positive Kontrolle für verwendete Methode zur Identifikation von Interaktionspartnern. Parallel dazu wurde das dem N-CoR2 verwandte Molekül N-CoR auf eine Interaktion mit C/EBP $\beta$  CR1-4 getestet.

Als Interaktionspartner der transaktivierenden Region von C/EBP $\beta$  wurde außerdem die Lysin-Methyltransferase G9a identifiziert (Tabelleneintrag Nr. 60). Das Protein gehört zur Suvar3-9 Familie und methyliert präferenziell Lysin-9 in Histon H3 *in vitro* (Tachibana *et al.*, 2001). In Säugerzellen scheint G9a die vorherrschende euchromatische H3K9-Methyltransferase zu sein, denn eine Deletion des Gens verringert den H3K9-Methylierungsstatus in euchromatischen chromosomalen Bereichen (Tachibana *et al.*, 2002). Die katalytische Aktivität von G9a ist in der SET-Domäne enthalten. *In vitro* können N-terminal gelegene Peptide des Histons H3 durch G9a mono-, di- und trimethyliert werden, wobei die Katalyse durch eine Deletion der SET-Domäne verhindert wird (Patnaik *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2005). Neben der SET-Domäne besitzt G9a sieben Ankyrin repeats, welche Wechselwirkungen mit anderen Proteinen vermitteln können.

Die direkte Bindung zwischen dem epigenetischen Regulator G9a und C/EBP $\beta$  könnte Hinweise auf eine bislang unbekannte Chromatin-assoziierte Funktion von C/EBP $\beta$  geben. Darüber hinaus wurden durch massenspektrometrische Untersuchungen Monomethylierungen von C/EBP $\beta$  an Lys-39 und Lys-168 nachgewiesen (Knoblich, Vermeulen, Mann und Leutz, unpubliziert). Die nachfolgenden Untersuchungen sollten deshalb außerdem klären, ob G9a für die Methylierung von C/EBP $\beta$  verantwortlich ist und ob es als Folge davon zu Veränderungen der Aktivität des Transkriptionsfaktors kommt.

Eintrag 79 der Tab. 3.1 zeigt als Interaktionspartner Notch1. Der Notch-Signalweg besitzt einen sehr einfachen Aufbau und liegt in allen Metazoa konserviert vor

(Ehebauer *et al.*, 2006). Er wirkt über direkte Zell-Zell-Kontakte auf Entscheidungen in Entwicklungsprozessen und beeinflusst dabei Differenzierung, Proliferation und Apoptose in verschiedenen Geweben und Organen. Notch-Rezeptoren sind einzelpass Membranrezeptoren und empfangen Signale von Liganden der DSL-Familie (Delta (*Drosophila*)/Serrate (*Drosophila*)/LAG-2 (*C. elegans*)), welche größtenteils ebenfalls Transmembran-Proteine sind. Die Bindung von Liganden an Notch-Rezeptoren induziert Proteolyse durch den  $\gamma$ -Sekretase-Enzymkomplex an der inneren Zellmembran und ein intrazelluläres Notch-Fragment („Notch intracellular domain“, NICD) entsteht, welches in den Zellkern gelangen kann. Transkriptionsfaktoren der CSL-Familie (CBF (Säuger)/Suppressor of Hairless (*Drosophila*)/LAG-1 (*C. elegans*)) sind die Hauptmoleküle zur Vermittlung von Notch-Signalen (Lai, 2002). Ohne Notch-Signale sind CSL-Proteine mit Korepressor-Komplexen assoziiert und die CSL-abhängige Genexpression reprimiert. Die Komposition der Korepressor-Komplexe ist für verschiedene Spezies recht unterschiedlich. Gemeinsames Merkmal ist jedoch die Anwesenheit von Histon-Deacetylasen (HDACs) (Kao *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999). Durch die Bindung von Notch an CSL kommt es zur Verdrängung von Korepressoren und zu einer Rekrutierung von Koaktivator-Komplexen, welche Mastermind/LAG-3/SEL-8 und Histon-Acetyltransferasen enthalten (Doyle *et al.*, 2000; Petcherski und Kimble, 2000; Wu *et al.*, 2000; Kitagawa *et al.*, 2001). CSL kann nun Zielgene aktivieren. Notch-Signale führen also zur Umschaltung von transkriptioneller Repression zu transkriptioneller Aktivierung CSL-abhängiger Zielgene. Es wird vermutet, dass CSL eine Reihe von unterschiedlichen Genen kontrolliert, da viele biologische Prozesse über Notch gesteuert werden. Die am besten charakterisierten Zielgene von CSL in Säugern und *Drosophila* sind „basic helix-loop-helix“ Proteine der Hairy/E(spl) (HES) Familie (Bailey und Posakony, 1995; Iso *et al.*, 2003). Diese scheinen ihrerseits als transkriptionelle Repressoren zu wirken. Die Fähigkeit von Notch, diese Repressoren positiv zu verstärken, könnte die Funktion von Notch als „Anti-Differentiationssignal“ erklären.

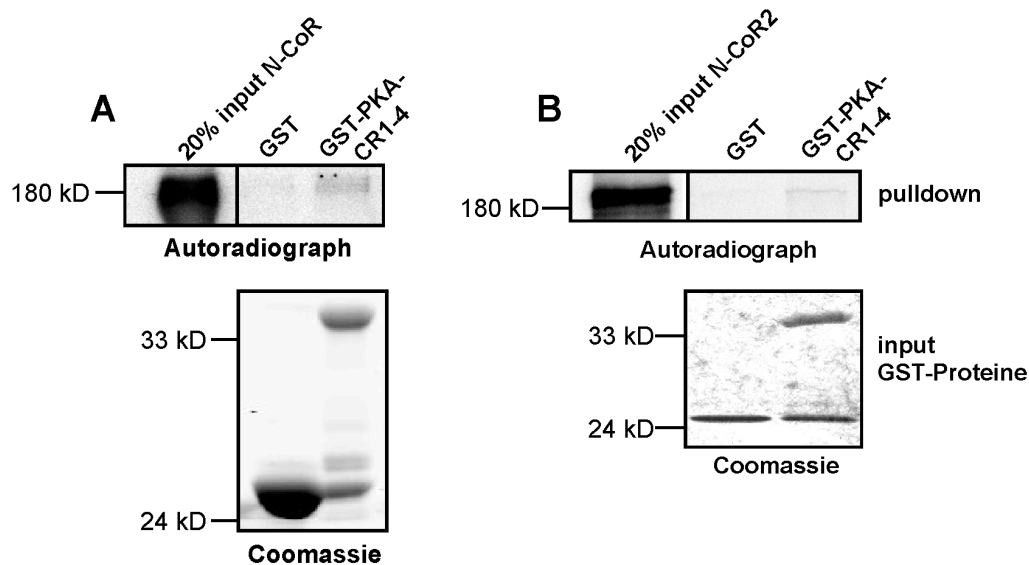
NICD besteht aus mehreren Domänen, die zwischen Mitgliedern der Notch-Familie konserviert sind. Die Bindung zwischen NICD und CSL erfolgt über die N-terminal gelegene RAM-Domäne in der NICD (Tamura *et al.*, 1995). Im zentralen Bereich des Proteins befinden sich Ankyrinmotive, welche Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Im C-Terminus befindet sich die PEST-Sequenz, über welche die Proteinstabilität reguliert wird. Zwischen Ankyrinmotiven und PEST-Sequenz ist die Aminosäuresequenz zwischen den einzelnen Familienmitgliedern weniger stark konserviert. Für Notch1 und 2 wurde in dieser Region eine transaktivierende Funktion postuliert, da Gal4-Fusionen zu einer Erhöhung der Aktivität in Reportergenstudien führen können (Kurooka *et al.*, 1998). Darüber hinaus kann diese Region mit Histon-Acetyltransferasen interagieren (Kurooka und Honjo, 2000).

Die direkte Interaktion zwischen Notch1 und C/EBP $\beta$  könnte auf eine Verbindung des Notch-Signalwegs mit dem transkriptionellen Effektor C/EBP $\beta$  hindeuten. Das würde bedeuten, dass Notch-Signale auch über andere Transkriptionsfaktoren als CSL vermittelt werden und die Transkription CSL-unabhängiger Zielgene steuern können, wie bereits vorgeschlagen wurde (Martinez Arias *et al.*, 2002).

### 3.3 N-CoR und das verwandte N-CoR2 binden an die C/EBP $\beta$ TAD

Um die bei der Hybridisierung gefundene direkte Interaktion zwischen der transaktivierenden Region von C/EBP $\beta$  und N-CoR (Tabelleneintrag Nr. 82) bzw. dem verwandten Molekül N-CoR2/SMRT (Tabelleneintrag Nr. 83) zu verifizieren, wurden GST-Bindungsstudien durchgeführt (Abb. 3.9). N-CoR bzw. N-CoR2 wurden in der Gegenwart von  $^{35}\text{S}$ -haltigem Methionin *in vitro* transkribiert und translatiert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden anschließend mit an Glutathion-Sepharose ge-

bundenem GST bzw. GST-PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 inkubiert und anschließend ungebundenes Protein durch Waschen entfernt. Bei dem GST-Fusionsprotein handelt es sich um dasselbe Protein, mit dem der Protein-Macroarray inkubiert wurde. Die Assoziation der Proteine wurde mittels Autoradiographie nachgewiesen. Abb. 3.9 A zeigt, dass N-CoR war in der Lage war, spezifisch an das GST-C/EBP $\beta$ -Fusionsprotein zu binden. Eine direkte Bindung an die TAD von C/EBP $\beta$  konnte auch für N-CoR2 gezeigt werden (Abb. 3.9 B). Diese Interaktion wurde parallel zu den hier gezeigten Versuchen von einer anderen Gruppe bestätigt (Ki *et al.*, 2005). Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass unter Verwendung radioaktiv markierter Proteinsonden sowohl bekannte als auch neue Interaktionspartner auf Protein-Macroarrays identifiziert werden können.



**Abb. 3.9: N-CoR und N-CoR2/SMRT binden die transaktivierende Region von C/EBP $\beta$  in GST-Bindungsstudien.** (A) 3  $\mu$ g GST bzw. GST-PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 wurden an Glutathion-Sepharose gebunden. N-CoR wurde von dem Plasmid pcDNA3-N-CoR mit dem „TnT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System“ *in vitro* translatiert und für 1 h mit den GST-Proteinen inkubiert. Nach häufigem Waschen mit Bindungspuffer wurde die Glutathion-Sepharose auf einem 8% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurde das SDS-Polyacrylamidgel getrocknet und radioaktiv markierte Proteine mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Nach der Exposition wurde das Gel in SDS-PAGE Laufpuffer rehydriert und die GST-Proteine mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. (B) Wie (A), nur dass N-CoR2/SMRT von dem Plasmid pcDNA3-N-CoR2 *in vitro* translatiert wurde.

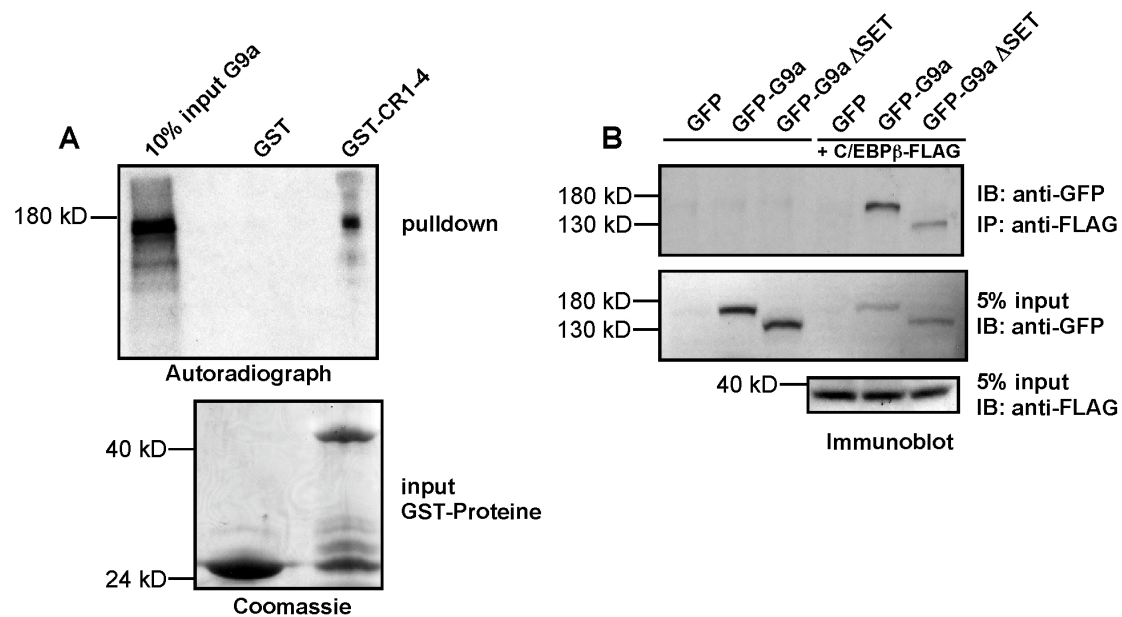
### 3.4 Lysin-Methylierung von C/EBP $\beta$ durch G9a führt zu transkriptioneller Repression

#### 3.4.1 G9a interagiert mit C/EBP $\beta$ in GST-Bindungsstudien und Koimmunopräzipitationsexperimenten

Die auf dem Protein-Macroarray gefundene Interaktion wurde mit GST-Bindungsstudien verifiziert. Dafür wurde G9a *in vitro* translatiert und durch den Einbau von  $^{35}$ S-haltigem Methionin radioaktiv markiert. Das Protein wurde anschließend mit Matrix-gebundenem GST bzw. GST-C/EBP $\beta$  CR1-4 inkubiert und ungebundenes Protein durch wiederholtes Waschen entfernt. Die Proteinkomplexe wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und markiertes Protein wurde durch Autoradiographie nachgewiesen. G9a zeigte eine Bindung an das GST-PKA-C/EBP $\beta$ -

Fusionsprotein, nicht aber an GST-Protein (Abb. 3.10 A). Demnach konnte eine direkte Bindung von G9a an die transaktivierende Region von C/EBP $\beta$  *in vitro* bestätigt werden.

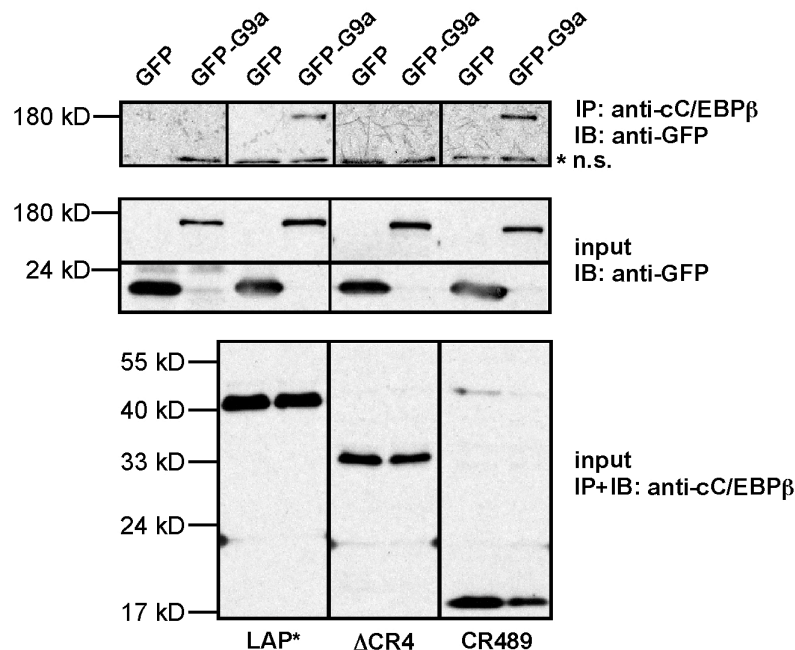
Die Interaktion von G9a und C/EBP $\beta$  wurde darüber hinaus in Koimmunopräzipitationsexperimenten überprüft (Abb. 3.10 B). Expressionsplasmide, welche für C/EBP $\beta$  und G9a bzw. G9a mit einer fehlenden SET-Domäne kodieren (G9a  $\Delta$ SET), wurden in HEK-293 Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nach 48 h geerntet, lysiert und C/EBP $\beta$ -FLAG zusammen mit assoziierten Proteinen an eine FLAG-Affinitätsmatrix gebunden. Die Identifikation von C/EBP $\beta$  und assoziierten Proteinen erfolgte mittels SDS-PAGE und Immunoblot. G9a bindet auch in diesem Experiment C/EBP $\beta$ . Die Interaktion ist unabhängig von der katalytischen SET-Domäne in G9a, die Bindungsstärke nimmt jedoch bei einem Fehlen der SET-Domäne ab.



**Abb. 3.10: Die Lysin-Methyltransferase G9a bindet C/EBP $\beta$ .** (A) GST-Bindungsstudie zwischen G9a und der transaktivierenden Region von C/EBP $\beta$ . 3  $\mu$ g GST bzw. GST-PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 wurden an Glutathion-Sepharose Affinitätsmatrix gebunden. G9a wurde von dem Plasmid pcDNA3-hG9a *in vitro* translatiert und für 1 h mit den gebundenen GST-Proteinen inkubiert. Matrix-gebundene Proteine wurden auf einem 8% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und radioaktiv markiertes Protein mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Nach der Exposition wurde das Gel rehydriert und Proteine mit Coomassie-Lösung angefärbt. (B) Koimmunopräzipitationsstudie zwischen C/EBP $\beta$  LAP\*-FLAG und GFP-G9a bzw. GFP-G9a  $\Delta$ SET. pCMV-GFP, pCMV-GFP-G9a bzw. pCMV-GFP-G9a  $\Delta$ SET wurden zusammen mit pcDNA3-C/EBP $\beta$  LAP\*-FLAG transient in HEK-293 Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und mittels „Anti-FLAG M2 Affinity Gel“ immunopräzipitiert (IP). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot (IB) mit anti-GFP bzw. anti-FLAG Antikörpern detektiert.

Zur Eingrenzung der Interaktionsdomäne in C/EBP $\beta$  wurden weitere Koimmunopräzipitationsstudien durchgeführt. Dazu wurden C/EBP $\beta$ -Konstrukte verwendet, welches nur über die konservierte Region 4 und die bZIP-Region (CR489) verfügten bzw. über eine Deletion der konservierten Region 4 (C/EBP $\beta$   $\Delta$ CR4). Diese wurden alleine oder in Kombination mit GFP-G9a in HEK-293 Zellen transfiziert und interagierende Proteine mit anti-C/EBP $\beta$  Antikörper immunopräzipitiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.11 dargestellt. Durch Immunopräzipitation von C/EBP $\beta$  CR489 konnte GFP-

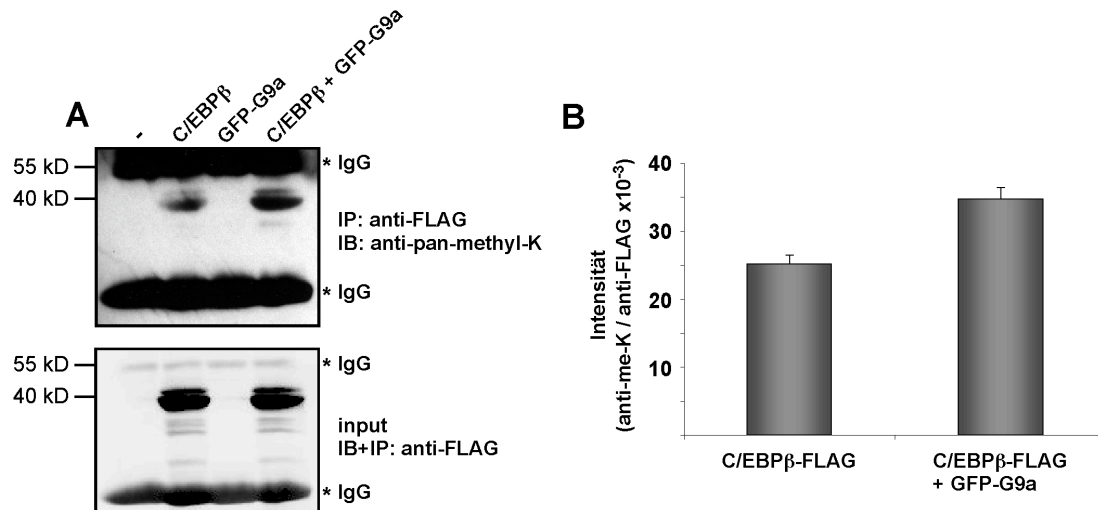
G9a kopräzipitiert werden. Die Verwendung der  $\Delta$ CR4-Mutante führte hingegen zu einem Verlust der Bindung an G9a. Durch die Experimente in Abb. 3.10 und 3.11 konnte damit die direkte Interaktion zwischen C/EBP $\beta$  und G9a gezeigt werden. Dabei ist die CR4 in C/EBP $\beta$  die minimale Interaktionsdomäne zwischen den beiden Proteinen.



**Abb. 3.11: G9a interagiert mit CR4 in C/EBP $\beta$ .** Koimmunopräzipitationsstudie zwischen C/EBP $\beta$  CR489 und GFP-G9a und verschiedenen C/EBP $\beta$ -Mutanten. pCMV-G9a wurde zusammen mit pcDM8-C/EBP $\beta$  LAP\*, CR489 oder  $\Delta$ CR4 transient in HEK-293 Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und mittels anti-C/EBP $\beta$  immunopräzipitiert (IP). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot (IB) mit anti-GFP bzw. anti-C/EBP $\beta$  Antikörpern detektiert (n.s.: nicht spezifisch).

### 3.4.2 C/EBP $\beta$ ist an Lysinresten methyliert und die Methylierung kann durch G9a verstärkt werden

Durch massenspektrometrische Untersuchungen von aufgereinigtem C/EBP $\beta$  konnten methylierte Lysine an Position Lys-39 und Lys-168 in C/EBP $\beta$  identifiziert werden (Knoblich, Vermeulen, Mann und Leutz, unpubliziert). Um zu untersuchen, ob G9a den Anteil von methyliertem C/EBP $\beta$  erhöhen kann, wurde C/EBP $\beta$ -FLAG alleine oder zusammen mit G9a in HEK-293 Zellen exprimiert, immunopräzipitiert und der Anteil an methylierten Lysinen im Präzipitat bestimmt. Hierzu wurde ein anti-pan-methyl-Lysin Antikörper benutzt, welcher gegen jegliche Form methylierter Lysine gerichtet ist (mono- als auch di- und trimethyliert). Abb. 3.12 A zeigt im unteren Teil das immunopräzipitierte C/EBP $\beta$  und den Lysin-methylierten Anteil an C/EBP $\beta$  im oberen Immunoblot. Abb. 3.12 B zeigt die Quantifizierung der Immunoblots aus Abb. 3.12 A durch Bestimmung der relativen Signalstärken unter zu Hilfenahme eines Li-Cor Odyssey Scanners. Während der Anteil an gesamt-C/EBP $\beta$  in beiden Spuren ungefähr gleich ist, steigt der Anteil an Lysin-methyliertem C/EBP $\beta$  durch Koexpression von G9a um den Faktor 1,4. Die Lysin-Methyltransferase G9a erhöht demnach den Anteil von Lysin-methyliertem C/EBP $\beta$  am gesamten C/EBP $\beta$ -Protein der Zelle.

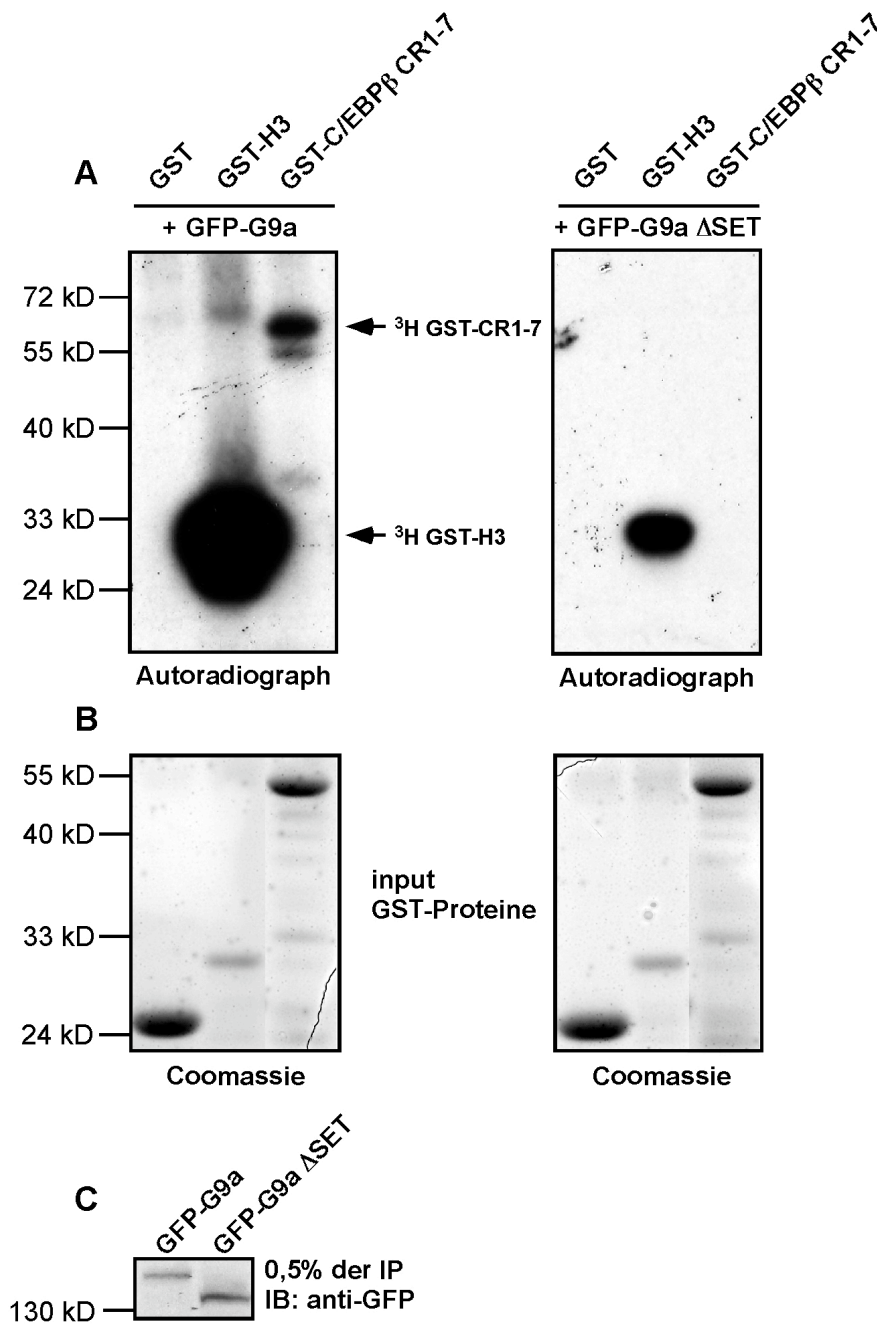


**Abb. 3.12: G9a verstärkt die Lysin-Methylierung von C/EBPβ.** (A) pcDNA-C/EBPβ-FLAG wurde alleine oder in Kombination mit pCMV-GFP-G9a transient in HEK-293 Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und mittels anti-FLAG Affinitätsmatrix immunopräzipitiert (IP). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot (IB) mit anti-pan-methyl-Lysin bzw. anti-FLAG Antikörpern detektiert. (B) Quantifizierung der Signale. C/EBPβ-FLAG wurde mit einem anti-Maus Alexa 680 Antikörper (rot) detektiert. Lysin-methyliertes C/EBPβ wurde mit einem anti-Kaninchen Alexa 800 Antikörper (grün) detektiert. Die fluoreszierenden Signale wurden auf einem Odyssey Imager detektiert und quantifiziert. Gezeigt sind die Quotienten der Intensitäten (grünes Signal / rotes Signal). Die Standardabweichung ergibt sich aus zwei individuellen Experimenten.

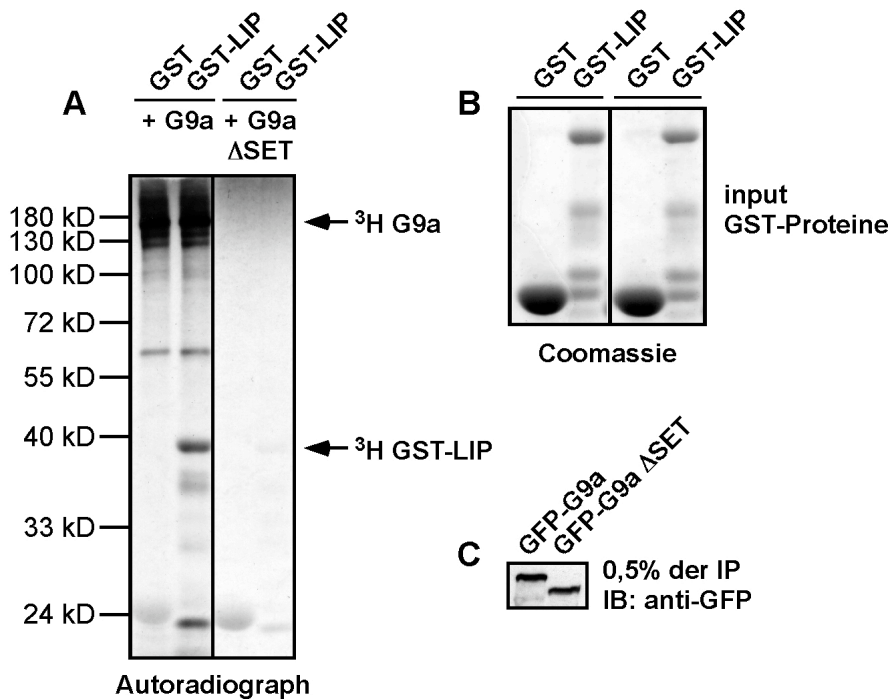
Um zu testen, ob G9a für die direkte Methylierung von C/EBPβ verantwortlich ist, wurden darüber hinaus *in vitro* Methyltransferase-Assay durchgeführt. Als Substrat für die Reaktion wurde sowohl C/EBPβ CR1-7 (Abb. 3.13) als auch GST-LIP (Abb. 3.14) verwendet. Das vollständige C/EBPβ konnte als GST-Fusionsprotein nicht exprimiert werden und deshalb wurden zwei Proteine auf ihre Methylierbarkeit getestet, welche in ihrer Sequenz jedoch das gesamte Protein abdecken. Die Substrate werden dann mit dem <sup>3</sup>H-markiertem Methyl-Donor S-Adenosyl-Methionin inkubiert. Katalysiert wird die Reaktion mit der zu untersuchenden Methyltransferase. In diesem Fall wurde G9a oder eine katalytisch inaktive Mutante mit einer Deletion der SET-Domäne in HEK-293 Zellen exprimiert und immunopräzipitiert. Die Präzipitate könnten dann direkt in die Reaktion eingesetzt werden.

Abb. 3.13 und 3.14 zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen. Dabei wird deutlich, dass G9a in der Lage ist, GST-CR1-7 und GST-LIP *in vitro* zu methylieren. Die Markierung von GST ist dabei nicht möglich und dient als Negativkontrolle. Histon H3 dient als positive Kontrolle für die Aktivität des Enzyms. G9a zeigt darüber hinaus die Fähigkeit zur Automethylierung. Durch eine Deletion der katalytischen SET-Domäne geht die Fähigkeit zur Automethylierung verloren und auch GST-CR1-7 bzw. GST-LIP können nicht methyliert werden. G9a ist somit in der Lage, spezifisch C/EBPβ zu methylieren.





**Abb. 3.13: Die Histon-Lysin N-Methyltransferase G9a methyliert GST-C/EBPβ CR1-7 *in vitro*.** (A) Die *in vitro* Methylierung von rekombinantem GST-C/EBPβ (CR1-7) bzw. GST erfolgte durch Konjugation  $^3\text{H}$ -markierter  $\text{CH}_3$ -Gruppen. S-Adenosyl-Methionin diente dabei als Methyl-Donor. G9a bzw. G9a  $\Delta\text{SET}$  wurden als GFP-Fusionsproteine in HEK-293-Zellen exprimiert, daraus immunopräzipitiert und direkt in die Reaktion eingesetzt. Die Reaktion wurde für 4 h bei  $30^\circ\text{C}$  durchgeführt. Anschließend wurden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt, das SDS-Polyacrylamidgel getrocknet und radioaktiv markiertes Protein mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. (B)  $5\text{ }\mu\text{g}$  GST bzw. GST-C/EBPβ CR1-7 wurden in die Reaktion eingesetzt. Nach erfolgter Exposition wurde das Gel aus (A) rehydriert und mit Coomassie-Lösung angefärbt. (C) pCMV-GFP-G9a bzw. pCMV-GFP-G9a  $\Delta\text{SET}$  wurden in HEK-293-Zellen exprimiert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert, GFP-G9a bzw. GFP-G9a  $\Delta\text{SET}$  immunopräzipitiert und mittels Immunoblot mit anti-GFP-Antikörpern detektiert.



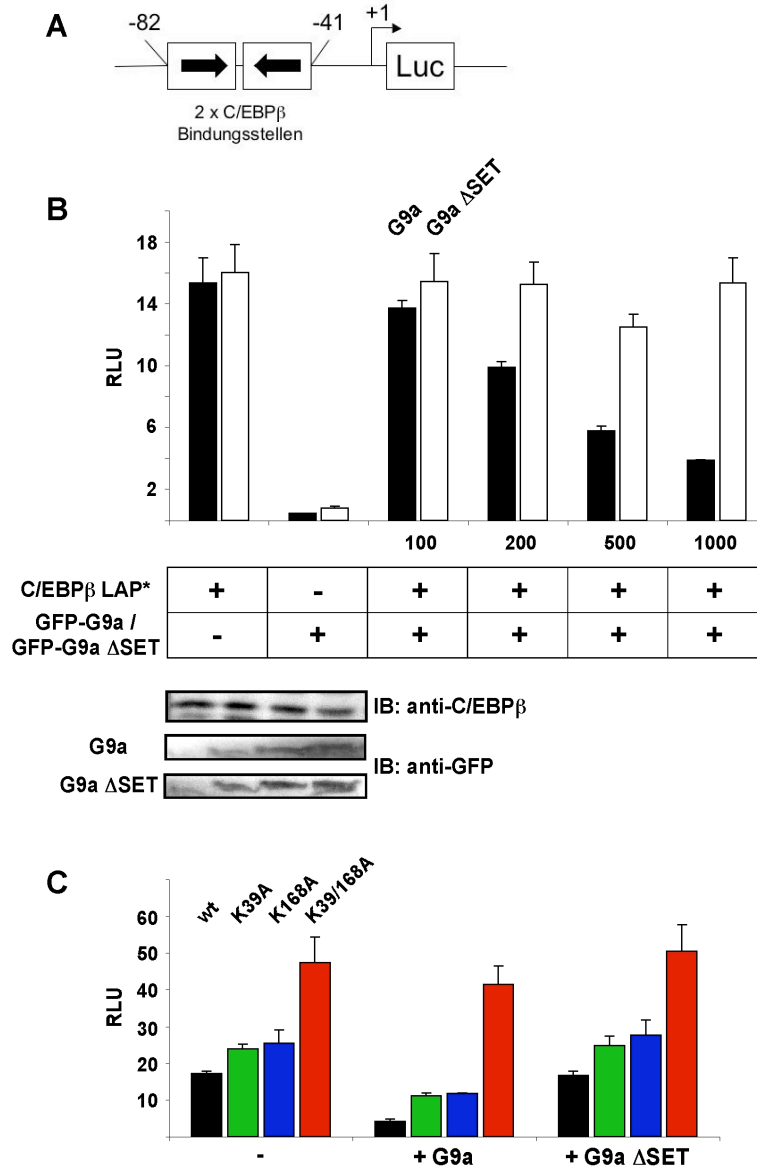
**Abb. 3.14: Die Histon-Lysin N-Methyltransferase G9a methyliert die LIP Isoform von C/EBP $\beta$  *in vitro*** (A) Die *in vitro* Methylierung von rekombinantem GST-C/EBP $\beta$  (LIP Isoform) bzw. GST erfolgte durch Konjugation  $^3\text{H}$ -markierter  $\text{CH}_3$ -Gruppen. S-Adenosyl-Methionin diente dabei als Methyl-Donor. G9a bzw. G9a  $\Delta\text{SET}$  wurden als GFP-Fusionsproteine in HEK-293-Zellen exprimiert, daraus immunopräzipitiert und direkt in die Reaktion eingesetzt. Die Reaktion wurde für 4 h bei  $30^\circ\text{C}$  durchgeführt. Anschließend wurden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt, das SDS-Polyacrylamidgel getrocknet und radioaktiv markiertes Protein mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. (B) 5  $\mu\text{g}$  GST bzw. GST-C/EBP $\beta$  LIP wurden in die Reaktion eingesetzt. Nach erfolgter Exposition wurde das Gel aus (A) rehydriert und mit Coomassie-Lösung angefärbt. (C) pCMV-GFP-G9a bzw. pCMV-GFP-G9a  $\Delta\text{SET}$  wurden in HEK-293-Zellen exprimiert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert, GFP-G9a bzw. GFP-G9a  $\Delta\text{SET}$  immunopräzipitiert und mittels Immunoblot mit anti-GFP-Antikörpern detektiert.

### 3.4.3 Die G9a SET-Domäne ist verantwortlich für die transkriptionelle Repression von C/EBP $\beta$

Um den Einfluss von G9a auf die transkriptionellen Eigenschaften von C/EBP $\beta$  zu bestimmen, wurden Reporterstudien durchgeführt. Hierfür wurde das C/EBP $\beta$ -abhängige Reporterkonstrukt pM82 verwendet (Sterneck *et al.*, 1992a; Sterneck *et al.*, 1992b). Es verfügt über zwei C/EBP $\beta$ -Bindungsstellen in der Promotorregion (Abb. 3.15 A). G9a, nicht aber G9a  $\Delta\text{SET}$ , ist in der Lage, die transkriptionelle Aktivität von C/EBP $\beta$  konzentrationsabhängig zu reprimieren (Abb. 3.15 B). Durch Kotransfektion von G9a kann eine bis zu fünffache Reduktion der Reporterexpression im Vergleich zum Ansatz ohne G9a gemessen werden. Bei Kotransfektion von G9a  $\Delta\text{SET}$  ändert sich die Expression des Reportergens nicht. Die Anwesenheit der SET-Domäne ist demnach eine notwendige Voraussetzung für die Repression von C/EBP $\beta$  durch die Lysin-Methyltransferase G9a. Desweiteren wurde der Einfluß von G9a auf die monomethylierten Lysinreste untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl die K39A- als auch die K168A-Mutante etwas aktiver als das unveränderte Protein war. Die Doppelmutante K39/168A war etwa zwei- bis dreifach aktiver als das C/EBP $\beta$  Protein. Im Vergleich zum unveränderten C/EBP $\beta$  Protein

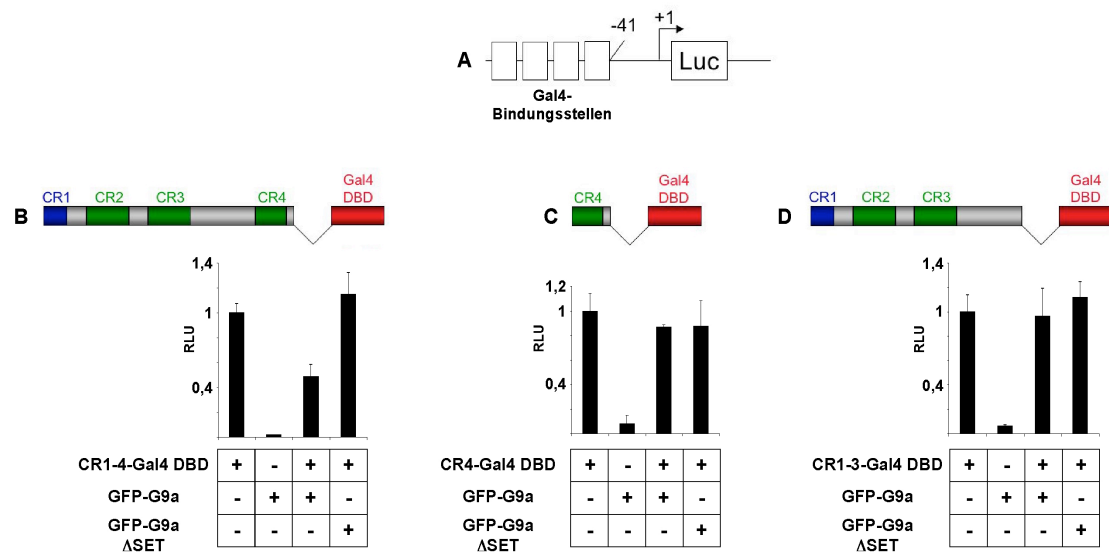


waren darüber hinaus die Einzelmутanten weniger stark durch G9a reprimierbar (Abb. 3.15 C). Die Doppelmutante ist kaum mehr durch G9a reprimierbar. Auch in diesem Experiment konnten die transkriptionellen Eigenschaften von C/EBP $\beta$  nicht durch G9a  $\Delta$ SET beeinflusst werden.



**Abb. 3.15: Die G9a SET-Domäne und die monomethylierten Lysine K39 und K168 in C/EBP $\beta$  sind entscheidend für die Repression der C/EBP $\beta$  LAP\*-abhängigen Transkription.** (A) Schematische Darstellung des pM82 Reportergenkonstrukts. Die C/EBP $\beta$ -Bindungsstellen sind grau schattiert dargestellt. (B) pCMV-GFP-G9a bzw. pCMV-GFP-G9a  $\Delta$ SET und pcDM8-C/EBP $\beta$  LAP\* wurden zusammen mit dem Luciferase-Reportergenkonstrukt pM82 in HEK-293 Zellen transfiziert, nach 48 h lysiert und die relativen Lichteinheiten gemessen. Die Expression der verschiedenen G9a- bzw. C/EBP $\beta$ -Konstrukte wurde durch Immunoblot mit anti-GFP bzw. anti-C/EBP $\beta$  Antikörpern nachgewiesen. Die Zahlen unter der Graphik geben die Menge an transfiziertem pCMV-GFP-G9a bzw. -G9a  $\Delta$ SET-Plasmid an (in ng). (C) pCMV-GFP-G9a bzw. pCMV-GFP-G9a  $\Delta$ SET und pcDM8-C/EBP $\beta$  LAP\*, LAP\* K39A, LAP\* K168A und LAP\* K39/168A wurden zusammen mit dem Luciferase-Reportergenkonstrukt pM82 in HEK-293 Zellen transfiziert, nach 48 h lysiert und die relativen Lichteinheiten gemessen. RLU: Relative light units.

In einem weiterführenden Experiment wurde der Einfluß von G9a auf die TAD von C/EBP $\beta$  unter Zuhilfenahme von Fusionskonstrukten untersucht, bei denen unterschiedliche Abschnitte der C/EBP $\beta$  TAD an die Gal4-DNA-Bindungsdomäne fusioniert wurden. Es wurde ein Gal4-abhängiger Reporter verwendet (Abb. 3.16 A) und zum anderen die Konstrukte CR1-4-Gal4 DBD, CR4-Gal4 DBD und CR1-3-Gal4 DBD. In den Versuchen zeigte sich, dass G9a in der Lage war, die Aktivität der CR1-4 um den Faktor zwei zu senken (Abb. 3.16 B). Die G9a  $\Delta$ SET Deletionsmutante war dazu nicht in der Lage. Die Konstrukte CR4-Gal4 DBD oder CR1-3-Gal4 DBD wurden in ihrer Aktivität durch G9a oder G9a  $\Delta$ SET nicht beeinflusst (Abb. 3.16 C-D). Diese Versuche zeigen, dass die Bindung von G9a an CR4 keine hinreichende Bedingung, jedoch eine Voraussetzung für die Repression des Transkriptionsfaktors ist. Das Vorhandensein der gesamten TAD, welche K39, nicht jedoch K168 beinhaltet, scheint für einen Teil der Repression durch G9a wichtig zu sein.

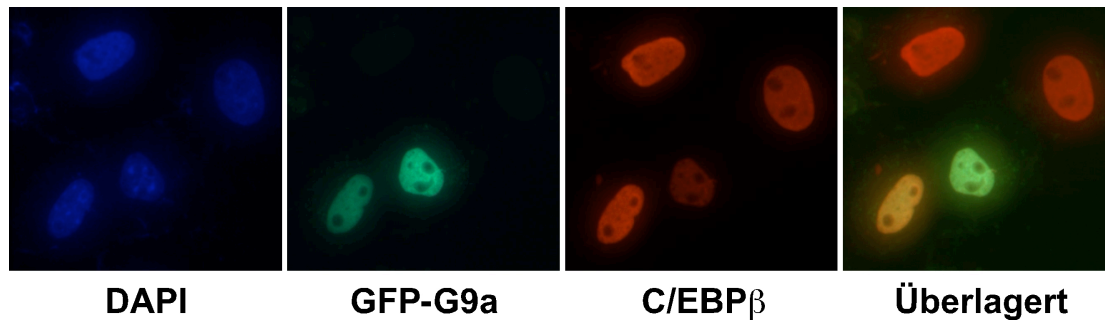


**Abb. 3.16: CR1-4-Gal4 DBD, jedoch nicht CR1-3-Gal4 DBD oder CR4-Gal4 DBD werden durch die SET-Domäne von G9a transkriptionell reprimiert.** (A) Schematische Darstellung des pM82 Reportergenkonstrukts, bei dem die zwei C/EBP $\beta$ -Bindungsstellen durch vier Gal4-Bindungsstellen ausgetauscht wurden. (B-D) pCMV-GFP-G9a bzw. pCMV-GFP-G9a  $\Delta$ SET Konstrukte wurden zusammen mit pcDM8-C/EBP $\beta$  CR1-4-Gal4 DBD (B), pcDM8-C/EBP $\beta$  CR4-Gal4 DBD (C) oder pcDM8-C/EBP $\beta$  CR1-3-Gal4 DBD (D) und dem unter (A) beschriebenen Gal4-abhängigen Reporterkonstrukt transient in HEK-293 Zellen transfiziert. Für die Normalisierung der Lichteinheiten gegen die Transfektionseffizienz wurden gleiche Mengen pCMV- $\beta$ -Galactosidase kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lichteinheiten wie unter „Material und Methoden“ beschrieben gemessen. Eine schematische Darstellung der C/EBP $\beta$  TAD-Gal4 DBD Konstrukte ist über der jeweiligen Abbildung gezeigt. RLU: Relative light units.

### 3.4.4 C/EBP $\beta$ und G9a kolokalisieren im Zellkern

Um zu bestimmen, ob die Methylierung und damit einhergehende Repression von C/EBP $\beta$  durch G9a durch eine Umverteilung von C/EBP $\beta$  im Zellkern erreicht wird, wurden Immunofluoreszenzstudien durchgeführt. Dazu wurden Cos-7 Zellen mit C/EBP $\beta$  und G9a Expressionsvektoren transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert, C/EBP $\beta$  Protein mit einem anti-C/EBP $\beta$  Antikörper angefärbt. Abbildung 3.17 zeigt das Ergebnis der Kolokalisationsstudie. GFP-G9a und C/EBP $\beta$  zeigen eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale zusammen mit DAPI und damit eine Kolokali-

sation im Zellkern. Es konnte jedoch keine Veränderung der Lokalisation von C/EBP $\beta$  bei einer Kotransfektion von G9a beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



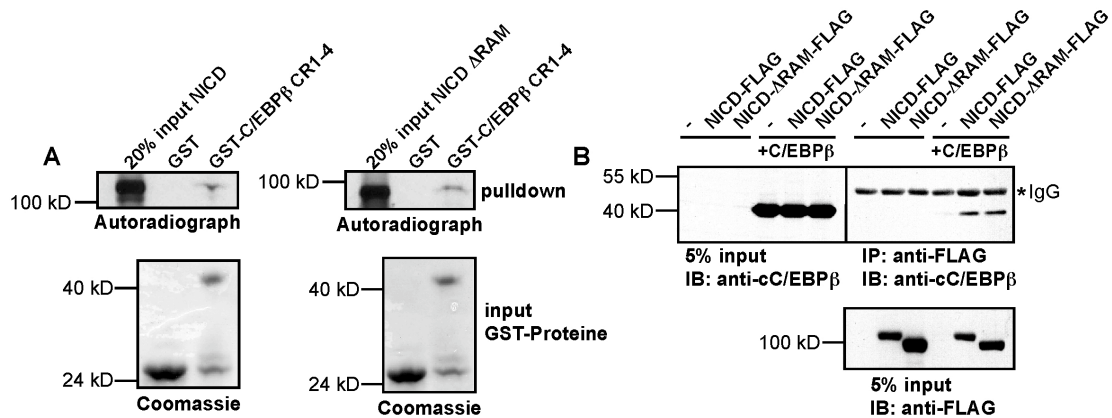
**Abb. 3.17: C/EBP $\beta$  und G9a zeigen eine Kolokalisation im Zellkern.** Immunofluoreszenz-mikroskopie von Cos7-Zellen nach Transfektion mit C/EBP $\beta$  oder GFP-G9a. Die Zellen wurden nach 48 h mit 4% PFA-Lösung (Histofix) fixiert, permeabilisiert und C/EBP $\beta$  mit einem anti-C/EBP $\beta$  Antiserum und einem Alexa Fluor 555 gekoppelten anti-Kaninchen IgG ange-färbt (rot). Die GFP-G9a Fusionsproteine konnten direkt sichtbar gemacht werden (grün). Kern-DNA wurde mittels DAPI angefärbt und mit UV-Licht sichtbar gemacht (blau). Bereiche, die Kolokalisieren zeigen durch die Überlagerung eine gelbliche Färbung.

### 3.5 Die Notch1 IC Domäne ist ein Koaktivator für die C/EBP $\beta$ -abhängige Transkription

#### 3.5.1 NICD bindet C/EBP $\beta$ in GST-Bindungs- und Koimmunopräzipitationsexperimenten

Der auf dem Protein-Macroarray gefundene Klon an Position 239/163 (Duplikat 236/164) enthielt die intrazelluläre Domäne von Notch1. C/EBP $\beta$  könnte demnach ein direktes Zielmolekül für Notch1-Signaltransduktionskaskaden sein. Diese Interaktion wurde in nachfolgenden Experimenten einer weiteren Analyse unterzogen. Dazu wurden zunächst GST-Bindungsstudien durchgeführt. NICD bzw. NICD mit einer Deletion der RAM-Domäne ( $\Delta$ RAM) wurden *in vitro* transkribiert und in Anwesenheit von  $^{35}$ S-Methionin translatiert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden mit GST bzw. mit GST-C/EBP $\beta$  CR1-4 Fusionsproteinen inkubiert und direkte Interaktionen mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die in Abb. 3.18 A dargestellten Ergebnisse bestätigen, dass C/EBP $\beta$  CR1-4 und NICD direkt interagieren können. Darüber hinaus kann auch die NICD-Mutante, die keine N-terminale RAM-Domäne besitzt, mit C/EBP $\beta$  CR1-4 interagieren. Das RAM-Interaktionsmodul ist also nicht notwendig für die Bindung an C/EBP $\beta$ .

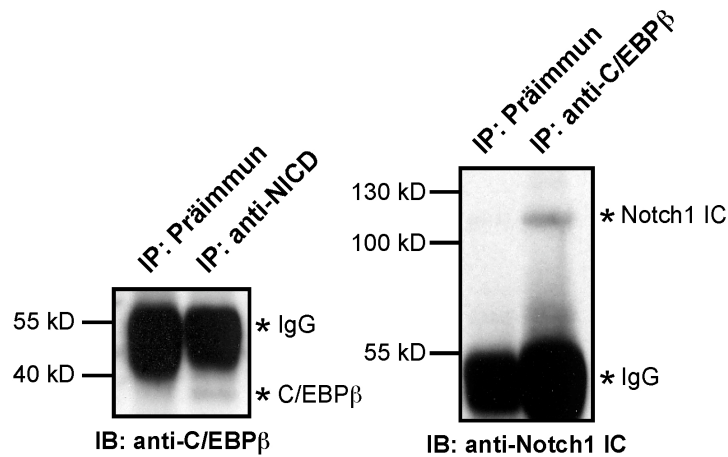
Die Interaktion zwischen C/EBP $\beta$  und Notch1 auf dem Protein-Macroarray wurde darüber hinaus durch Koimmunopräzipitationsexperimente bestätigt. Expressionsplasmide, welche für C/EBP $\beta$  und Notch1 IC bzw. Notch1 IC mit einer fehlenden N-terminalen RAM-Domäne kodieren, wurden in HEK-293 Zellen transfiziert und diese nach 48 h geerntet. Das Ergebnis in Abb. 3.18 B zeigt eine Bindung von Notch1 IC als auch von Notch1 IC  $\Delta$ RAM an C/EBP $\beta$ . Demnach binden C/EBP $\beta$  und Notch1 IC auch in Zellen unabhängig von der RAM-Domäne aneinander.



**Abb. 3.18: Notch1 IC bindet C/EBPβ unabhängig von der RAM-Domäne.** (A) GST-Bindungsstudie zwischen Notch1 IC bzw. Notch1 IC ΔRAM und der transaktivierenden Region von C/EBPβ. 3 μg GST bzw. GST-C/EBPβ CR1-4 wurden an Glutathion-Sepharose Affinitätsmatrix gebunden. Notch1 IC bzw. Notch1 IC ΔRAM wurden von den Plasmiden pcDNA3-FLAG-Notch1 IC bzw. pcDNA3-FLAG-Notch1 IC ΔRAM *in vitro* translatiert und für 1 h mit den gebundenen GST-Proteinen inkubiert. Radioaktiv markierte Proteine wurden auf einem 8% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Nach erfolgter Exposition wurde das Gel rehydriert und Proteine mit Coomassie-Lösung angefärbt (input GST-Proteine). (B) Koimmunopräzipitation zwischen Notch1 IC und C/EBPβ. pcDNA3-FLAG-Notch1 IC, pcDNA3-FLAG-Notch1 IC ΔRAM und pcDM8-C/EBPβ LAP\* Konstrukte wurden transient in HEK-293 Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und mittels „Anti-FLAG M2 Affinity Gel“ immunopräzipitiert. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und interagierende Proteine durch Immunoblot mit anti-C/EBPβ Antikörpern detektiert.

### 3.5.2 Endogene Notch1 IC- und C/EBPβ-Proteine interagieren miteinander

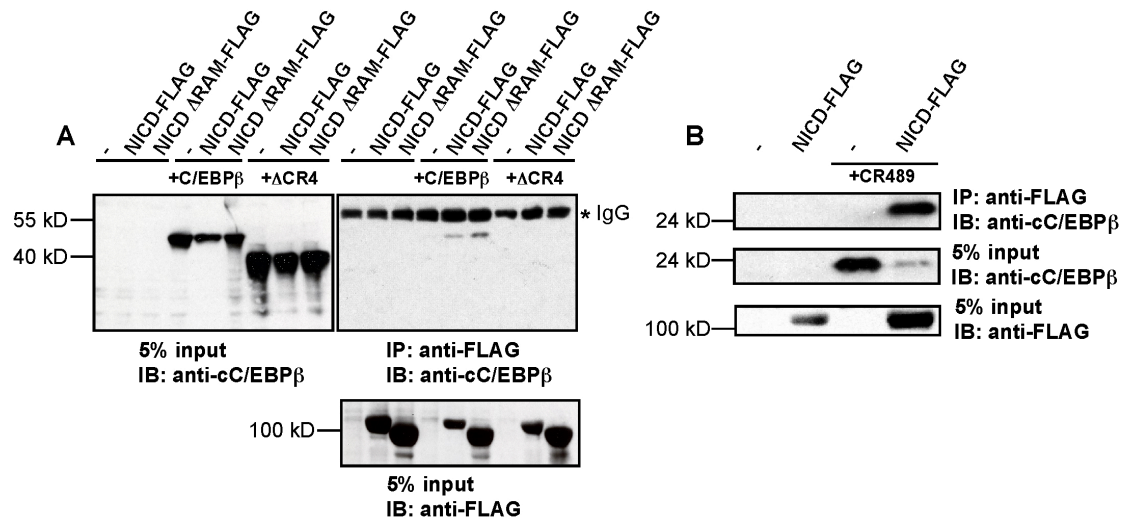
Die Zelllinie Jurkat wurde aus peripherem Blut eines Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie der T-Zellen (T-ALL) gewonnen (Schneider *et al.*, 1977). In der Hälfte aller Fälle von T-ALL liegen Mutationen im Notch1-Gen vor, welche zu einer Aktivierung des Proteins führen können (Weng *et al.*, 2004). Der Notch1-Signalweg ist deshalb in dieser Zelllinie in hohem Maße aktiv und es liegen verhältnismäßig große Mengen an Notch1 IC vor. Um zu überprüfen, ob die Interaktion zwischen Notch1 IC und C/EBPβ auch zwischen endogen exprimierten Proteinen vorliegen kann, wurden Koimmunopräzipitationsstudien aus Lysaten von Jurkat-Zellen durchgeführt (Abb. 3.19). Durch Inkubation mit einem N1CD-spezifischen Antikörper konnte C/EBPβ koimmunopräzipitiert werden. Im reziproken Ansatz konnte Notch1 nach Inkubation mit einem C/EBPβ-spezifischen Antikörper koimmunopräzipitiert werden.



**Abb. 3.19: Endogen exprimiertes C/EBP $\beta$  und NICD interagiert in Jurkat T-ALL Zellen.** Koimmunopräzipitation zwischen Notch1 IC und C/EBP $\beta$ . Pro Ansatz wurden  $10^6$  Jurkat-Zellen lysiert und mit 2  $\mu$ g anti-NICD bzw. anti-C/EBP $\beta$  Antikörper oder Präimmunsereum inkubiert. An Protein A-Sepharose gebundene Antikörper-Antigen-Komplexe wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und interagierende Proteine durch Immunoblot mit anti-C/EBP $\beta$  bzw. anti-NICD Antikörper detektiert.

### 3.5.3 CR4 in C/EBP $\beta$ vermittelt die Bindung an Notch1 IC

Die nachfolgenden Experimente dienten der weiteren Eingrenzung der Interaktionsdomäne in C/EBP $\beta$ . Die Daten der Protein-Macroarray Hybridisierung und der GST-Bindungsstudie legen die Vermutung nahe, dass die Assoziation zwischen NICD und C/EBP $\beta$  über die Transaktivierungsdomäne vermittelt wird. Deshalb wurden Koimmunopräzipitationsstudien mit verschiedenen Deletionsmutanten dieser Region durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine Deletion der CR4 zum Verlust der Bindung an NICD führt (Abb. 3.20 A). Das Konstrukt C/EBP $\beta$  CR489, welches nur aus der CR4 der transaktivierenden Region und der bZIP-Region besteht, war jedoch in der Lage, die intrazelluläre Domäne von Notch1 zu binden (Abb. 3.20 B). Die Bindung zwischen den Molekülen wird also über die CR4 der transaktivierenden Region von C/EBP $\beta$  vermittelt und ist unabhängig von der RAM-Domäne in Notch1 IC.



**Abb. 3.20: Die konservierte Region 4 (CR4) in C/EBPβ vermittelt die Bindung an Notch1 IC und Notch1 IC ΔRAM.** (A) Die Konstrukte pcDNA3-FLAG-Notch1 IC, pcDNA3-FLAG-Notch1 IC ΔRAM und pcDM8-C/EBPβ LAP\* bzw. pcDM8-C/EBPβ ΔCR4 wurden transient in HEK-293 Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und mittels „Anti-FLAG M2 Affinity Gel“ immunopräzipitiert. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und interagierende Proteine durch Immunoblot mit anti-C/EBPβ Antikörper detektiert. (B) Wie (A), nur hier wurde neben pcDNA3-FLAG-Notch1 IC das Konstrukt pcDM8-C/EBPβ CR489 verwendet.

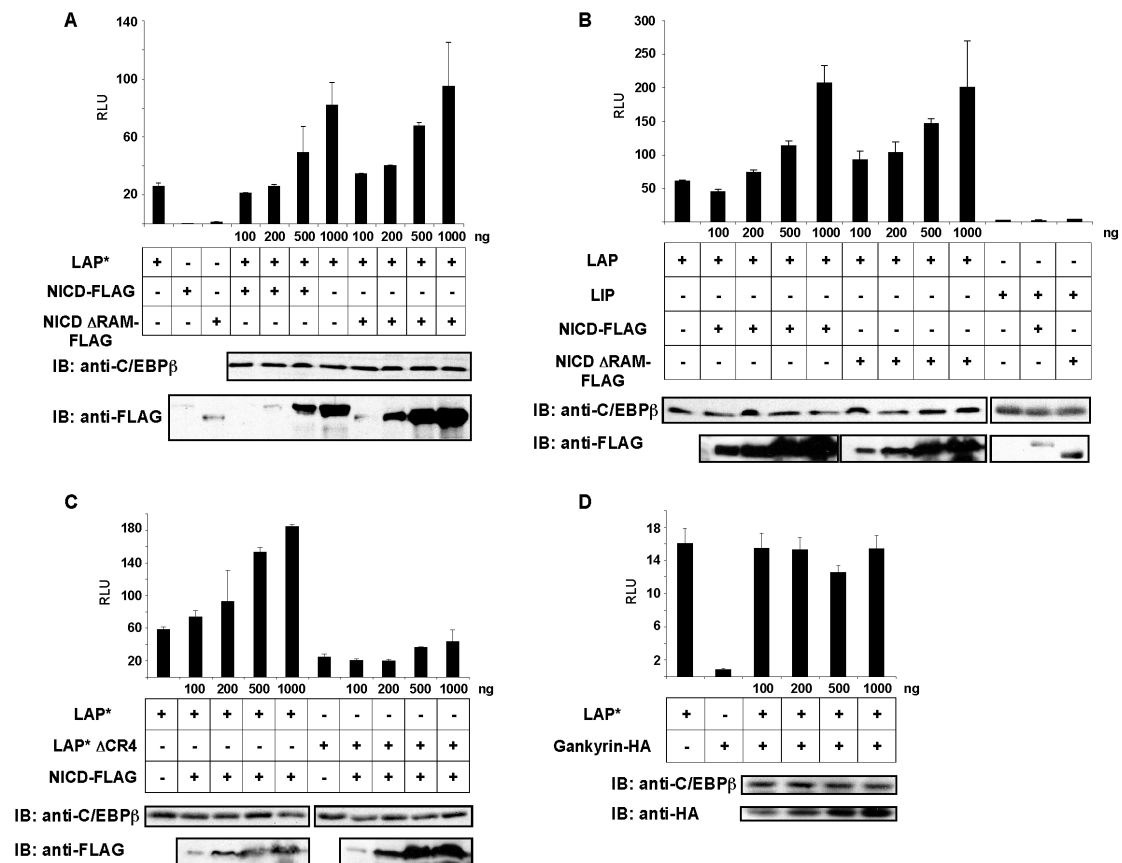
### 3.5.4 Notch1 IC wirkt als Koaktivator für C/EBPβ

#### 3.5.4.1 Notch1 IC erhöht die C/EBPβ-abhängige Transkription in Reporter-genstudien

Um zu überprüfen, ob der Notch-Signalweg einen Einfluß auf C/EBPβ-abhängige Transkriptionsprozesse hat, wurden Reporter-genstudien mit dem C/EBPβ-abhängigen pM82 Luciferase-Reporterkonstrukt durchgeführt. Abb. 3.21 A zeigt, dass sowohl Notch1 IC als auch Notch1 IC ΔRAM in der Lage sind, die transkriptionelle Aktivität von C/EBPβ (LAP\* Isoform) vier- bis fünffach zu erhöhen. Die Stärke der Koaktivierung korreliert dabei mit der Menge an kotransfiziertem Notch1 IC. Die LAP-Isoform von C/EBPβ ist ebenso aktivierbar wie LAP\* (Abb. 3.21 B). Die LIP-Isoform hingegen besitzt keine TAD und zeigt auch in Anwesenheit von Notch1 IC keine transkriptionelle Aktivität. Eine Deletion der CR4 in C/EBPβ LAP\*, welche die Bindung an Notch1 IC vermittelt, führt zu einer reduzierten Aktivierbarkeit durch Notch1 IC im Vergleich zu LAP\* (Abb. 3.21 C).

Abschließend sollte getestet werden, ob die C/EBPβ-abhängige Transkription durch andere Ankyrin-haltige Proteine beeinflusst wird oder ob dieser Effekt spezifisch für Notch1 IC ist. Dafür wurde das im C/EBPβ-Kontext unbekannte Protein Gankyrin verwendet, welches über fünf Ankyrin repeats verfügt. Gankyrin dient als regulatorische Untereinheit des 26S Proteasoms, welche für den ATP-abhängige Degradation ubiquitinierten Proteine verantwortlich ist. Gankyrin spielt eine Rolle in der Tumorentstehung als negativer Regulator der p53 und Rb Tumorsuppressor-Signalwege (Lozano und Zambetti, 2005). Abb. 3.21 D zeigt das Ergebnis der Reporter-gen-Studie. Gankyrin zeigt dabei keinen Einfluß auf die C/EBPβ-abhängige Transkription.

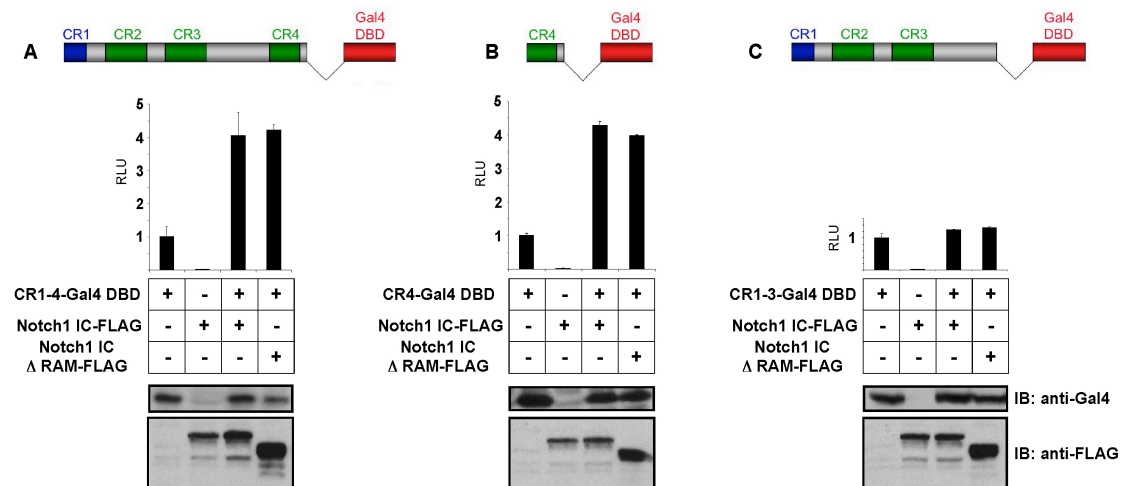




**Abb. 3.21: Notch1 IC ist ein Koaktivator für die C/EBP $\beta$ -abhängige Transkription.** (A) pcDNA3-NICD-FLAG oder pcDNA3-NICD  $\Delta$ RAM-FLAG wurden in Kombination mit pcDM8-C/EBP $\beta$  LAP\* und dem Luciferase-Reportergenkonstrukt pM82 in HEK-293 Zellen transfiziert. Für die Normalisierung der Lichteinheiten gegen die Transfektionseffizienz wurden gleiche Mengen pCMV- $\beta$ -Galactosidase kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lichteinheiten wie unter „Material und Methoden“ beschrieben gemessen. Die Expression der verschiedenen C/EBP $\beta$ -Isoformen und der verschiedenen Notch1-Konstrukte wurde durch Immunoblot (IB) mit anti-C/EBP $\beta$ - bzw. anti-FLAG Antikörpern nachgewiesen. (B) Wie (A), nur das pcDM8-C/EBP $\beta$  LAP und pcDM8-C/EBP $\beta$  LIP verwendet wurden. (C) Wie (A), nur das zusätzlich pcDM8-C/EBP $\beta$  LAP\*  $\Delta$ CR4 verwendet wurde. (D) Wie (A), nur das pcDNA3-Gankyrin-HA Expressionskonstrukte wurden zusammen mit pcDM8-C/EBP $\beta$  LAP\* verwendet wurden. Die Expression von C/EBP $\beta$  und Gankyrin wurde durch Immunoblot mit anti-C/EBP $\beta$  bzw. anti-HA Antikörpern nachgewiesen. RLU: Relative light units.

Die CR4 in C/EBP $\beta$  ist demnach wichtig für die Interaktion und Koaktivierung durch Notch1 IC. Um zu überprüfen, ob die CR4-vermittelte Koaktivierung unabhängig von der C/EBP $\beta$ -DNA-Bindungsdomäne ist, wurde die bZIP Region von C/EBP $\beta$  durch die Gal4-DNA-Bindungsdomäne ersetzt. Die verschiedenen Fusionskonstrukte zwischen der C/EBP $\beta$  TAD und der Gal4-DNA-Bindungsdomäne wurden auf einem Gal4-abhängigen Reporterkonstrukt getestet. Hierbei handelt es sich um ein modifiziertes pM82-Reporterkonstrukt, in dem die C/EBP $\beta$ -Bindungsstellen durch Gal4-Bindungsstellen ausgetauscht wurden. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Abb. 3.22 zusammengefasst. Während CR1-3-Gal4 DBD kaum auf eine Zugabe von Notch1 IC reagierte, zeigten sowohl CR1-4-Gal4 DBD als auch CR4-Gal4 DBD eine vier- bis fünffache Zunahme der transkriptionellen Aktivität. Damit konnte gezeigt werden, dass die CR4 sowohl die Bindung von Notch1 IC als auch die transkription-

nelle Aktivierung vermittelt und dass diese Effekte unabhängig von der DNA-bindenden Region von C/EBP $\beta$  sind.

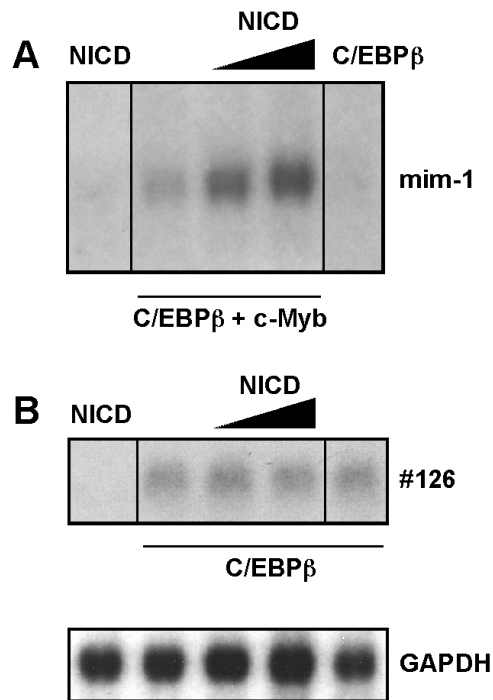


**Abb. 3.22: CR1-4-Gal4 DBD und CR4-Gal4 DBD, jedoch nicht CR1-3-Gal4 DBD, werden durch Notch1 IC transkriptionell aktiviert.** (A-C) pcDNA3-NICD-FLAG bzw. pcDNA3-NICD  $\Delta$ RAM-FLAG Konstrukte wurden zusammen mit pcDM8-C/EBP $\beta$  CR1-4-Gal4 DBD (A), pcDM8-C/EBP $\beta$  CR4-Gal4 DBD (B) oder pcDM8-C/EBP $\beta$  CR1-3-Gal4 DBD (C) und einem Gal4-abhängigen Reporterkonstrukt transient in HEK-293 Zellen transfiziert. Für die Normalisierung der Lichteinheiten gegen die Transfektionseffizienz wurden gleiche Mengen pCMV- $\beta$ -Galactosidase kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lichteinheiten wie unter „Material und Methoden“ beschrieben gemessen. Die Expression der Gal4-Konstrukte und der verschiedenen Notch1-Konstrukte wurde durch Immunoblot (IB) mit anti-Gal4 bzw. anti-FLAG Antikörpern nachgewiesen. Eine schematische Darstellung der C/EBP $\beta$  TAD-Gal4 DBD Konstrukte ist über der jeweiligen Abbildung gezeigt. RLU: Relative light units.

### 3.5.4.2 Notch1 IC erhöht die transkriptionelle Aktivität von C/EBP $\beta$ bei der Aktivierung differenzierungs-spezifischer Gene im Chromatin

C/EBP $\beta$  und c-Myb binden in Promotorbereichen von Genen, die eine wichtige Rolle bei myeloiden Differenzierungsprozessen spielen und kollaborieren bei deren Aktivierung (Tahirov *et al.*, 2002). Bei Koexpression dieser beiden Transkriptionsfaktoren können myeloide Gene, die im Chromatin eingebettet und abgeschaltet sind, in unterschiedlichsten Zelllinien, wie zum Beispiel Fibroblasten, angeschaltet werden. Diese Eigenschaft wurde im nachfolgenden Experiment ausgenutzt. Dafür wurden unterschiedliche Kombinationen von C/EBP $\beta$ , c-Myb und Notch1 IC in QT6-Fibroblasten transfiziert und nach 24 h Gesamt-RNA geerntet. Durch eine Northern-Hybridisierung wurden Transkripte von *mim-1*, einem myeloiden Markergen, detektiert und miteinander verglichen (Abb. 3.23 A). Dabei zeigte sich, dass Notch1 IC in der Lage war, die C/EBP $\beta$ /c-Myb abhängige Transkription residierender myeloider Gene noch zu verstärken. Andere C/EBP $\beta$ -abhängige Gene, wie beispielsweise Gen #126, werden durch NICD nicht in ihrer Expressionsstärke beeinflusst (Abb. 3.23 B).

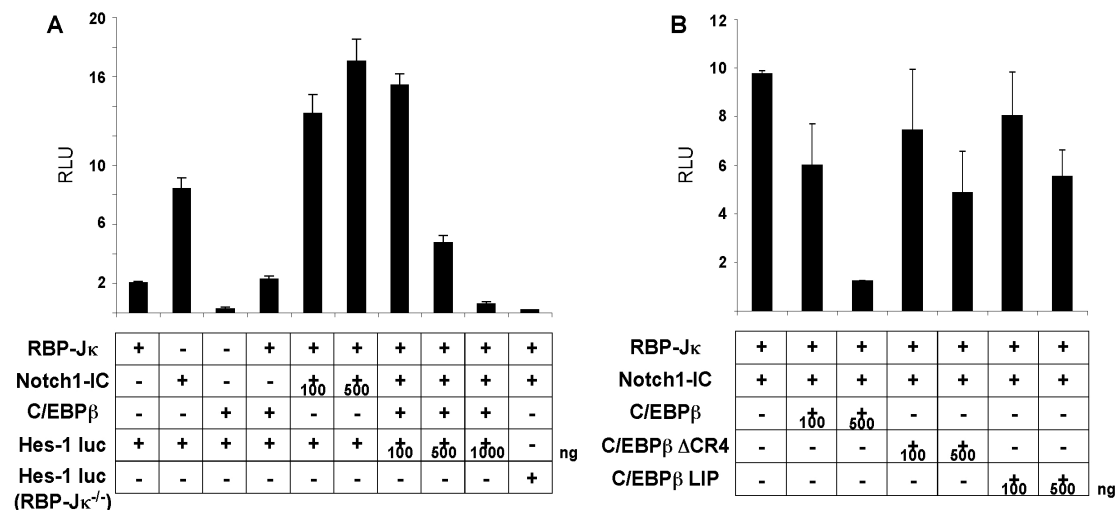




**Abb. 3.23: Notch1 IC kann die C/EBP $\beta$ -abhängige Transkription von myeloiden Genen in Fibroblasten verstärken.** pcDM8-C/EBP $\beta$ -, pcDNA1-c-Myb- und pcDNA-FLAG-Notch1 IC-Expressionskonstrukte wurden in QT6-Fibroblasten transfiziert und nach 24 h geerntet. Die zelluläre RNA wurde isoliert und polyA-haltige mRNA-Transkripte angereichert. Die RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit einer  $^{32}$ P-markierten *mim-1*- (A), *#126*- (B) oder GAPDH-Sonde hybridisiert. Die Exposition erfolgte über unterschiedlich lange Zeiträume.

### 3.5.5 C/EBP $\beta$ wirkt der Aktivierung von CSL/RBP-J $\kappa$ durch Notch1 IC entgegen

Um festzustellen, ob C/EBP $\beta$  einen Einfluß auf CSL/RBP-J $\kappa$ -abhängige Transkriptionsprozesse hat, wurden Reporterstudien mit einem Hes-1 Luciferase-Reporterkonstrukt durchgeführt. Hes-1 ist ein „klassisches“ Zielgen von RBP-J $\kappa$  und die Expression kann durch Notch1 IC verstärkt werden. In Reporterstudien konnte eine ca. sieben- bis neunfache Aktivierung des Hes-1 Reporters durch Kotransfektion von Notch1 IC beobachtet werden (Abb. 3.24 A). Eine Zugabe von C/EBP $\beta$  LAP\*-Expressionsplasmid konnte nun der Aktivierung des Hes-1 Reporters konzentrationsabhängig entgegenwirken. In Abb. 3.24 B wurde dieses Experiment parallel mit C/EBP $\beta$   $\Delta$ CR4 und LIP durchgeführt. Hier zeigte sich, dass diese beiden Proteine der RBP-J $\kappa$ -abhängigen Induktion durch Notch1 IC nicht in demselben Maße entgegenwirken können wie LAP\*. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Bildung von Notch1 IC-C/EBP $\beta$ -Komplexen, welche bei Anwesenheit der CR4 gebildet werden können. Die Notch1 IC-Moleküle liegen dann vermutlich nicht mehr in Verbindung mit RBP-J $\kappa$  vor und können nicht mehr gemeinsam den Hes-1 Promoter binden und dessen Transkription aktivieren.



**Abb. 3.24: C/EBPβ wirkt der Aktivierung von RBP-Jκ/CSL durch Notch1 IC entgegen.**

(A) Ein RBP-Jκ Expressionsvektor, pcDNA3-NICD-FLAG und verschiedene Hes-1 Reporter-Genkonstrukte wurden zusammen mit pcDM8-C/EBPβ LAP\* transient in QT6 Zellen transfiziert. Für die Normalisierung der Lichteinheiten gegen die Transfektionseffizienz wurden gleiche Mengen pCMV-β-Galactosidase kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lichteinheiten wie unter „Material und Methoden“ beschrieben gemessen. (B) Ein RBP-Jκ Expressionsvektor, pcDNA3-NICD-FLAG und verschiedene Hes-1 Reporter-Genkonstrukte wurden zusammen mit pcDM8-C/EBPβ LAP\*, LAP\* ΔCR4 oder LIP transient in QT6 Zellen transfiziert. Für die Normalisierung der Lichteinheiten gegen die Transfektionseffizienz wurden gleiche Mengen pCMV-β-Galactosidase kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lichteinheiten wie unter „Material und Methoden“ beschrieben gemessen. RLU: Relative light units.

### 3.6 Untersuchungen zur SUMOylierung von C/EBPβ

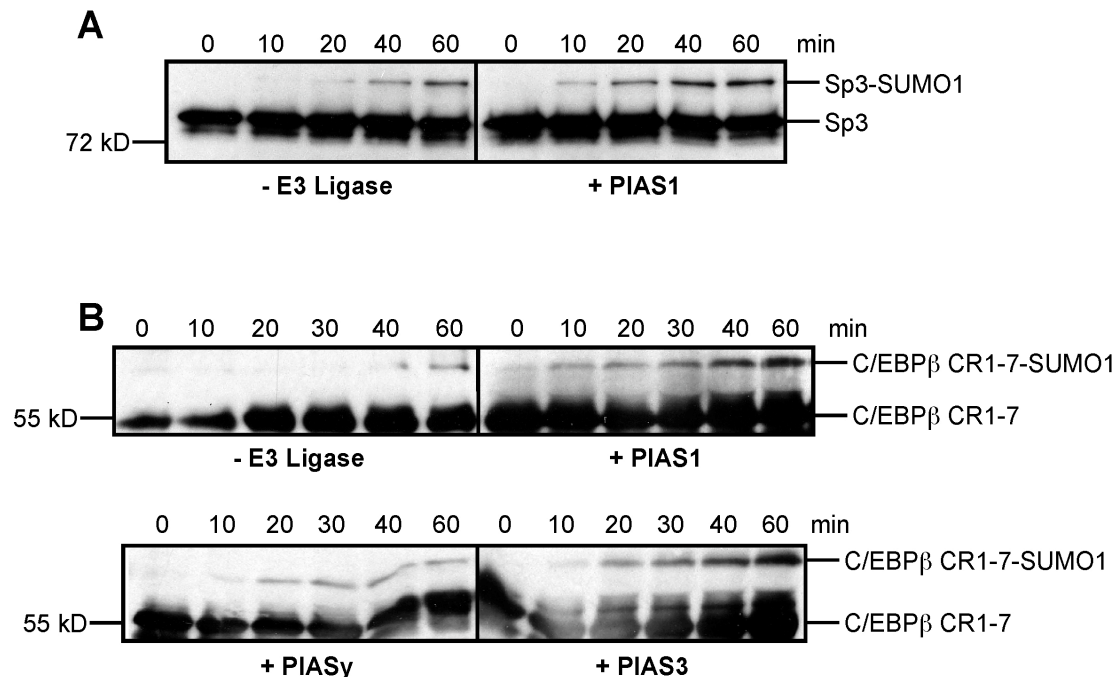
#### 3.6.1 PIAS3 und Ubc9 binden die regulatorische Region von C/EBPβ im Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Yeast 2-hybrid-System, Y2H) ermöglicht die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Um Interaktionspartner der regulatorischen Region von C/EBPβ zu identifizieren, wurde ein Yeast 2-hybrid-Screen mit den konservierten Regionen CR567 als „bait-Protein“ durchgeführt. Als „prey-Klone“ wurden unter anderem Ubc9 und PIAS3 identifiziert (Joschko und Leutz, unpubliziert). Diese Proteine sind Schlüsselproteine für die SUMO-Katalyse. Da PIAS-Proteine eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Aktivität von Transkriptionsfaktoren spielen (siehe auch Kap. 1.6), wurde nachfolgend die Interaktion zwischen PIAS3 und C/EBPβ detaillierter untersucht.

#### 3.6.2 PIAS-Proteine verstärken die SUMOylierung von C/EBPβ *in vitro*

Um den Einfluß von PIAS-Proteinen auf die SUMOylierung von C/EBPβ zu untersuchen, wurde C/EBPβ in An- bzw. Abwesenheit von PIAS1, PIASy oder PIAS3 *in vitro* SUMOyliert. Als positive Kontrolle wurde der Einfluß von PIAS1 auf die SUMOylierung von Sp3 untersucht. Dabei zeigte sich, dass das GST-PIAS1 in der Lage war, als E3-Ligase für Sp3 zu wirken und die SUMOylierung zu verstärken (Sapetschnig *et al.*, 2002) (Abb. 3.25 A). In Abb. 3.25 B ist der Einfluß der unterschiedlichen PIAS-

Proteine auf die SUMOylierung von C/EBP $\beta$  CR1-7 gezeigt. Ohne E3-Ligase verläuft die SUMOylierungsreaktion recht langsam ab. SUMO-modifiziertes Produkt ist erst nach 40 min Reaktionszeit sichtbar. Durch Zugabe von GST-PIAS1 oder GST-PIAS3 kann die SUMOylierungsreaktion stark beschleunigt werden. Erstes SUMOyliertes Produkt wurde schon nach 10 min gebildet. GST-PIASy kann die SUMOylierungsreaktion auch beschleunigen, jedoch nicht in dem Maße wie PIAS1 und PIAS3.



**Abb. 3.25: PIAS SUMO-E3-Ligasen verstärken die SUMOylierung von C/EBP $\beta$  *in vitro*.** (A) HA-FLAG-Sp3 Protein wurde in Ab- bzw. Anwesenheit von GST-PIAS1 *in vitro* SUMOyliert und der Reaktionsverlauf über eine Stunde verfolgt. SUMOyliertes und nicht-modifiziertes Protein wurde durch Immunoblot mit anti-HA Antikörpern detektiert. (B) GST-C/EBP $\beta$  CR1-7 Protein wurde in Ab- bzw. Anwesenheit von GST-PIAS1, GST-PIASy und GST-PIAS3 *in vitro* SUMOyliert und der Reaktionsverlauf über eine Stunde verfolgt. SUMOyliertes und nicht-modifiziertes Protein wurde durch Immunoblot mit anti-C/EBP $\beta$  Antikörper detektiert.

### 3.6.3 C/EBP $\beta$ -SUMO-1 interagiert mit der SP-RING Domäne von PIAS3

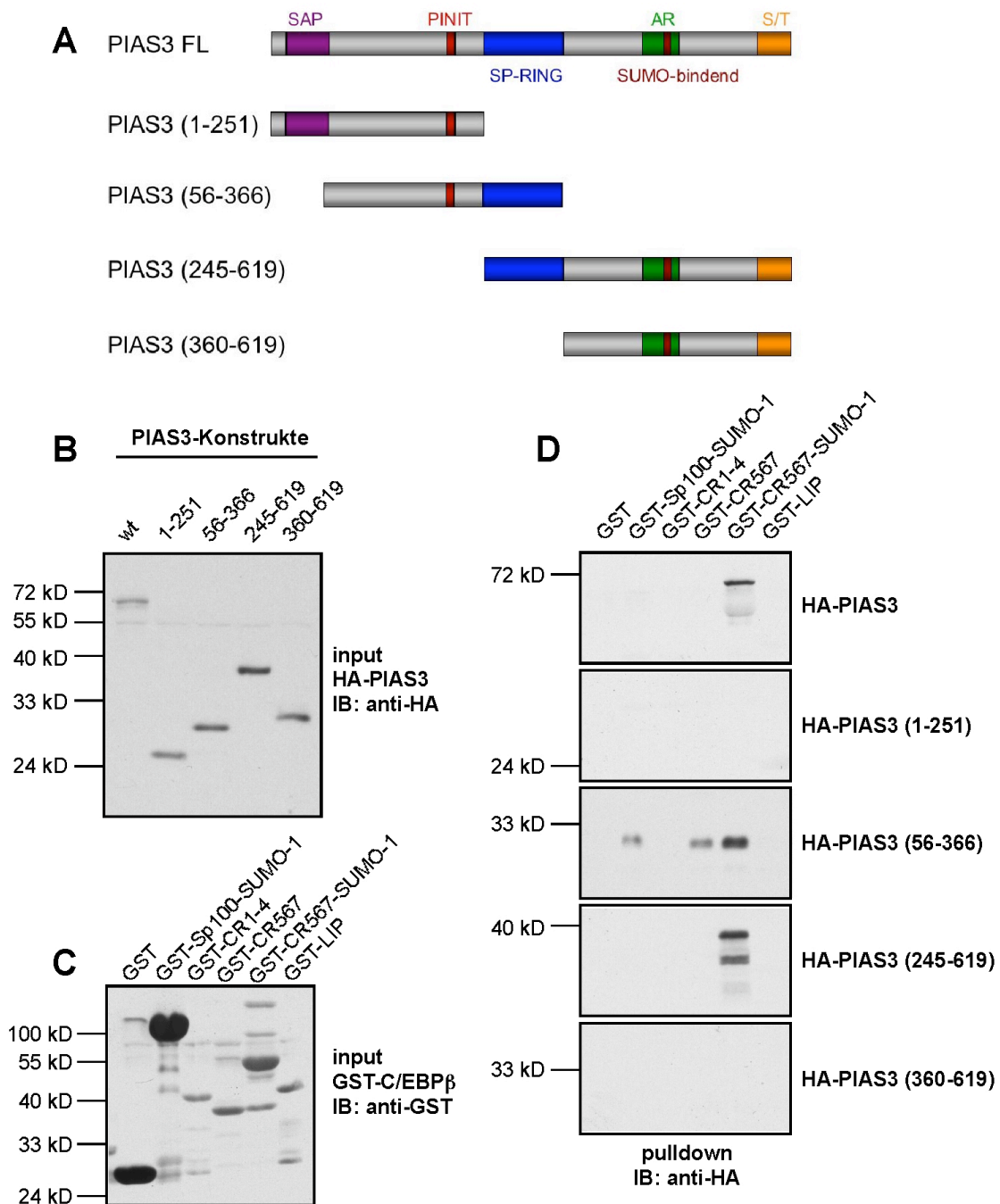
Um die Interaktion zwischen PIAS3 und C/EBP $\beta$  im Hefe-Zwei-Hybrid-System zu bestätigen wurden GST-Bindungsexperimente durchgeführt. PIAS3 und verschiedene Mutanten wurden in den prokaryotischen Expressionsvektor pIX-HA kloniert, um N-terminale HA-Fusionsproteine zu erhalten. Es wurden Mutanten hergestellt, die verschiedene konservierte Domänen enthielten (Abb. 3.26 A). Das Konstrukt PIAS3 1-251 enthält die N-terminal gelegene SAP-Domäne, PIAS3 56-366 enthält den SP-RING, PIAS3 245-619 enthält die C-terminale Sequenz des Proteins (SP-RING, saure Region mit SUMO-1 Bindungsstelle und S/T-reiche Region). PIAS3 360-619 enthält nur die C-terminalen Abschnitte. Die in *E. coli* exprimierten HA-PIAS3-Fusionsproteine sind in Abb. 3.26 B dargestellt.

Zusätzlich wurden GST-C/EBP $\beta$  Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Neben der Transaktivierungsregion (GST-CR1-4) wurden die regulatorische Region (GST-CR567) und die kurze Isoform LIP (GST-LIP) als GST-Fusionsproteine exprimiert. Darüber hinaus wurde ein System zur *in vivo* SUMOylierung von Proteinen verwendet (Mencia und de Lorenzo, 2004) (siehe auch Abb. 3.34). Mit diesem können SUMO-modifizierte Proteine im großen Maßstab hergestellt werden, im speziellen

SUMO-1-modifiziertes C/EBP $\beta$  CR567. Für die nachfolgenden Experimente wurde zudem eine Spezifitätskontrolle benötigt. Sp100 ist ein Bestandteil von PML-Körpern und liegt im Zellkern in SUMOylierter Form vor (Sternsdorf *et al.*, 1997). GST-Sp100 konnte zu einem hohen Maße mit SUMO-1 modifiziert werden. Die GST-Fusionsproteine sind in Abb. 3.26 C dargestellt.

Für die GST-Bindungsexperimente wurden die exprimierten GST-Proteine an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit den verschiedenen HA-PIAS3 Proteinen inkubiert. Nach häufigem Waschen wurden die gebundenen Proteine mittels Immunoblot mit anti-HA-Antikörpern analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.26 D zu sehen. Dabei wird deutlich, dass SUMO-modifiziertes C/EBP $\beta$  in der Lage war, PIAS3 zu binden. Dies war sowohl für HA-PIAS3 als auch für HA-PIAS3 56-366 und HA-PIAS3 245-619 der Fall. Die Konstrukte HA-PIAS3 1-251 und HA-PIAS3 360-619 konnten nicht von C/EBP $\beta$ , weder in der SUMO-modifizierten noch in der unmodifizierten Form, gebunden werden. Die Region 252-359, welche hauptsächlich den SP-RING von PIAS3 enthält, ist also für die Bindung an SUMOyliertes C/EBP $\beta$  verantwortlich.

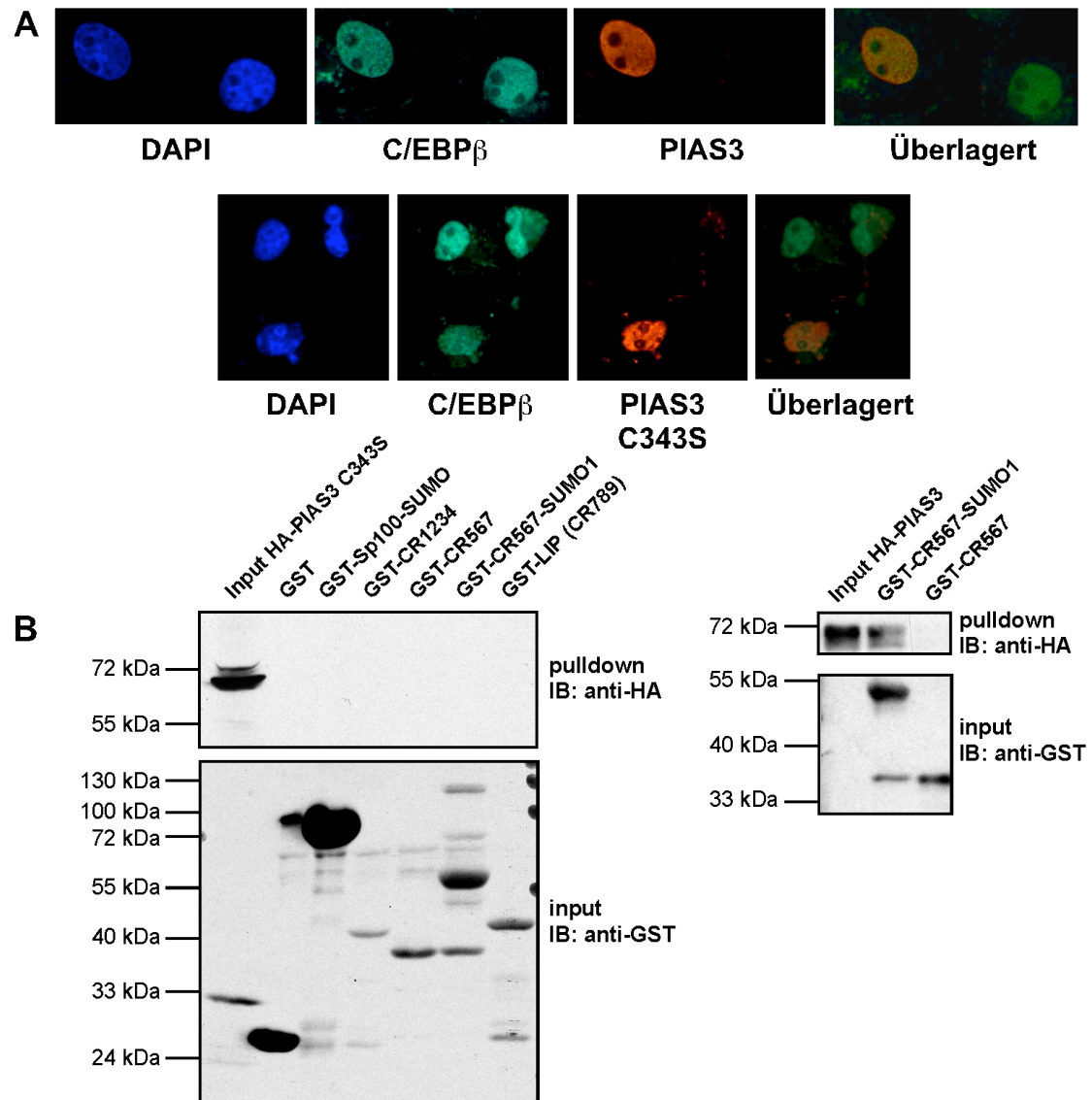
Es scheint so zu sein, dass die weiter C-terminal gelegenen Abschnitte in PIAS3, welche auch das SUMO-bindende Motiv (Aminosäuren 450-460) enthalten, die Bindung an SUMO-modifiziertes C/EBP $\beta$  unterstützen und Spezifität vermitteln. Eine Deletion dieser Bereiche führt zu einer schwachen Bindung an unmodifiziertes C/EBP $\beta$  CR567 und an GST-Sp100-SUMO-1 (Abb. 3.24 D).



**Abb. 3.26: Die SUMO-modifizierte Form von C/EBPβ interagiert mit der SP-RING Domäne von PIAS3.** (A) Schematische Representation der konservierten Domänen von PIAS3 und Expressionskonstrukte, welche für die nachfolgenden Arbeiten verwendet wurden. Die Zahlen geben die Position in der murinen PIAS3-Sequenz an. (B) PIAS3 und die verschiedenen Deletionsmutanten wurden als N-terminale HA-Fusionsproteine vom Vektor pIX-HA in *E. coli* exprimiert und im Immunoblot (IB) mit anti-HA-Antikörper detektiert (input HA-PIAS3). (C) Input der GST-C/EBPβ-Proteine und der GST-Sp100-SUMO-1-Kontrolle. Für jeden Ansatz wurden 3 µg der GST-C/EBPβ Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose gebunden. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit anti-GST-Antikörper detektiert. (D) GST-Bindungsstudie: Die unter (B) gezeigten HA-Fusionsproteine wurden mit den immobilisierten GST-Proteinen inkubiert und nach wiederholtem Waschen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Interagierende Proteine wurden mittels Immunoblot mit einem anti-HA-Antikörper detektiert.

Um zu untersuchen, ob die SP-RING-Domäne von PIAS3 in der Tat alleine für die Interaktion mit SUMOyliertem C/EBP $\beta$  verantwortlich ist, wurde diese mutiert. Die Punktmutation einer Aminosäure von Cystein zu Serin (C343S) in dem SP-RING führt zur Inaktivierung der E3-Ligase-Funktion von PIAS3 (Nakagawa und Yokosawa, 2002). Die Punktmutation wurde mittels „site directed mutagenesis“ eingefügt und durch direkte Sequenzierung nachgewiesen.

Um zu bestimmen, ob sich die subzelluläre Lokalisation der C343S-Mutante im Vergleich zu PIAS3 ändert, wurden Cos7-Zellen mit PIAS3 oder PIAS3 C343S transfiziert mittels Immunofluoreszenzmikroskopie analysiert. Dafür wurde das endogene C/EBP $\beta$ -Protein mit einem anti-C/EBP $\beta$  Antikörper markiert und PIAS3-Proteine mit anti-HA Antikörper nachgewiesen. Für die Färbung von Kern-DNA wurde DAPI verwendet. Das Ergebnis ist in Abb. 3.27 A gezeigt. C/EBP $\beta$  kolokalisiert mit PIAS3 im Kern, beide Proteine befinden sich nicht in den Nukleoli. Die Punktmutation im SP-RING führt nicht zu einer Veränderung der Lokalisation im Nukleoplasma. Parallel dazu wurde das Bindungsverhalten der PIAS3 C343S-Mutante an C/EBP $\beta$  getestet (Abb. 3.27 B). PIAS3 C343S wurde als N-terminales Fusionsprotein von dem prokaryotischen Expressionsvektor pIX-HA exprimiert. Für die GST-Bindungsstudie wurden die GST-C/EBP $\beta$  Proteine aus dem Versuch zu Abb. 3.26 verwendet. Es zeigte sich, dass die PIAS3 C343S-Mutante in diesem Versuch nicht mehr in der Lage war, C/EBP $\beta$  zu binden. Die intakte räumliche Struktur der SP-RING-Domäne ist demnach eine notwendige Voraussetzung für die Interaktion mit SUMO-modifiziertem C/EBP $\beta$ .

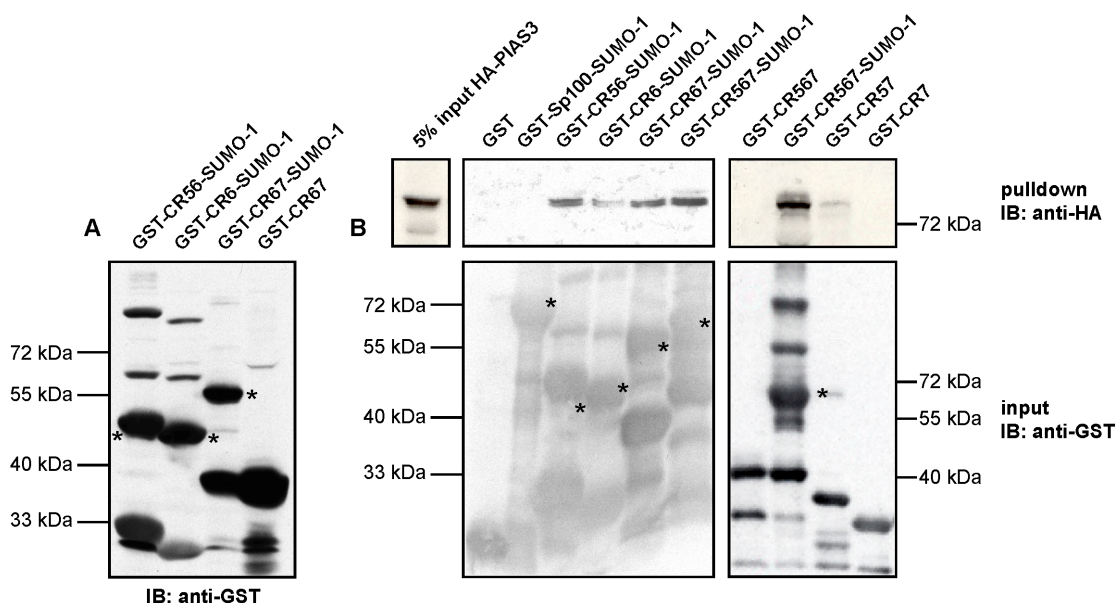


**Abb. 3.27: Eine Punktmutation in der SP-RING Domäne von PIAS3 unterbricht die Assoziation mit C/EBP $\beta$ -SUMO-1, aber ändert nicht dessen zelluläre Lokalisation. (A)** Immunofluoreszenzmikroskopie von Cos7-Zellen nach Transfektion mit HA-PIAS3 oder HA-PIAS3 C343S exprimierenden Vektoren. Die Zellen wurden nach 48 h mit 4% PFA-Lösung (Histofix) fixiert, permeabilisiert und endogenes C/EBP $\beta$  mit einem anti-C/EBP $\beta$  Antikörper (C-19) und einem Alexa Fluor 680 gekoppelten anti-Kaninchen IgG angefärbt (grün). Parallel dazu wurden die Zellen mit einem anti-HA Antikörper und einem Alexa Fluor 488 gekoppelten anti-Maus IgG gefärbt, um PIAS3-Fusionsproteine sichtbar zu machen (rot). Kern-DNA wurde mittels DAPI angefärbt und mit UV-Licht sichtbar gemacht (blau). **(B)** GST-Bindungsstudie zwischen C/EBP $\beta$  und PIAS3 C343S und zwischen C/EBP $\beta$  und PIAS3 als Positivkontrolle. HA-PIAS3 C343S und HA-PIAS3 wurden in *E. coli* exprimiert und mit immobilisierten GST-Proteinen inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und interagierende Proteine mittels Immunoblot (IB) mit einem anti-HA-Antikörper detektiert. Die verwendeten GST-Proteine (input) wurden mittels IB mit einem anti-GST-Antikörper nachgewiesen.



### 3.6.4 C/EBP $\beta$ CR6-SUMO-1 ist die minimale Interaktionsdomäne für die Interaktion mit PIAS3

Um den individuellen Einfluß der Regionen 5, 6 und 7 von C/EBP $\beta$  auf die Bindung von PIAS3 genauer zu verstehen, wurden Teile der regulatorischen Region von C/EBP $\beta$  (CR56, CR6 und CR67) als GST-Fusionsproteine exprimiert und im *E. coli*-System mit SUMO-1 konjugiert (Abb. 3.28 A). In GST-Bindungsstudien wurde anschließend das Bindungsverhalten an PIAS3 untersucht (Abb. 3.28 B). Die Proteine wurden dafür an Glutathion-Sepharose gebunden und mit rekombinantem HA-PIAS3 inkubiert. GST-CR567-SUMO-1 ist in der Lage, PIAS3 zu binden. Die Bindungsstärke nimmt ab, wenn Region 5 oder Region 7 fehlen. Am schwächsten ist die Bindung, wenn nur Region 6 in SUMOylierter Form vorliegt. Darüber hinaus kann eine schwache Interaktion zwischen GST-CR57 und PIAS3 detektiert werden. Zusammenfassen konnte also durch GST-Bindungsstudien gezeigt werden, dass die SP-RING Domäne von PIAS3 mit der SUMOylierten regulatorischen Region von C/EBP $\beta$  interagieren kann. Für die Interaktion ist die SUMOylierte Region 6 ausreichend, wobei die angrenzenden Regionen 5 und 7 die Bindung stabilisieren. Am stärksten jedoch bindet die gesamte regulatorische Region in ihrer SUMOylierten Form. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die C/EBP $\beta$ -PIAS3-Interaktion über die CR6-Domäne in ihrer SUMOylierten Form vermittelt wird und dass die angrenzenden Bereiche CR5 und CR7 diese Interaktion verstärken können.



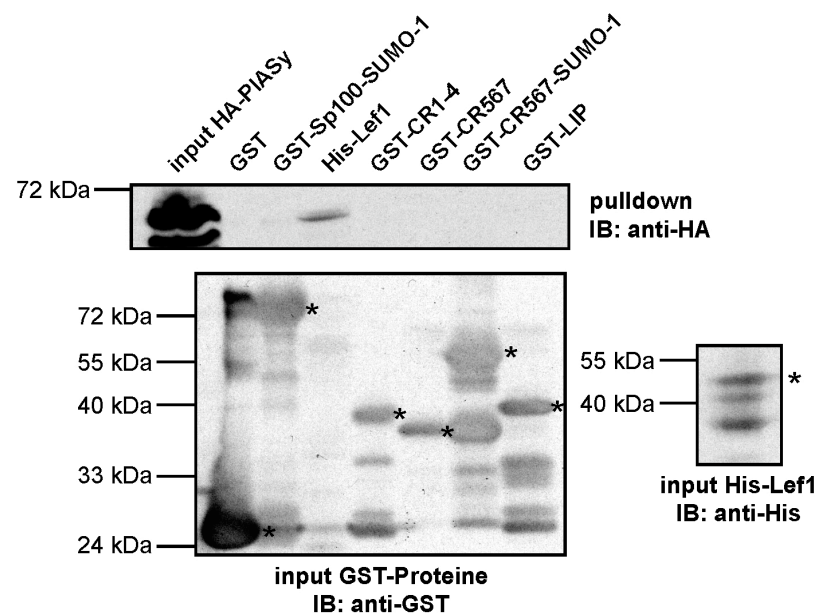
**Abb. 3.28: Die CR6 von C/EBP $\beta$  in ihrer SUMOylierten Form ist ausreichend für die Interaktion mit PIAS3.** (A) Expression und Affinitätsaufreinigung von unmodifizierten und SUMO-modifizierten GST-C/EBP $\beta$  Fusionsproteinen. pGEX-4T1-C/EBP $\beta$  CR56, CR6 bzw. CR67 Expressionskonstrukte wurden alleine oder in Anwesenheit der SUMOylierungsmaschinerie (pRHSUMO, pBADE12) in BL21 (DE3) Zellen exprimiert und mittels Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Die SUMOylierten Proteine sind mit einem \* markiert. Von dem jeweiligen Eluat wurden 3  $\mu$ g mit einem SDS-Polyacrylamidgel getrennt und mittels Immunoblot detektiert. (B) GST-Bindungsstudie: HA-PIAS3 wurde mit verschiedenen immobilisierten GST-C/EBP $\beta$  Proteinen inkubiert und nach wiederholtem Waschen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Interagierende Proteine wurden mittels Immunoblot (IB) mit einem anti-HA-Antikörper detektiert.



### 3.6.5 C/EBP $\beta$ interagiert nicht mit PIASy

Lymphoid enhancer factor 1 (Lef1) ist ein Mitglied der Familie der Transkriptionsfaktoren mit HMG-Domäne. Diese Proteine vermitteln Signale der Wnt-Signaltransduktionskaskade und übersetzen diese in differentielle Genexpression. PIASy ist ein Interaktionspartner von Lef1 und ist in der Lage, die Aktivität von Lef1 zu reprimieren (Sachdev *et al.*, 2001). Um die Spezifität der Interaktion zwischen PIAS3 und C/EBP $\beta$  zu zeigen, wurden Bindungsstudien zwischen PIASy und C/EBP $\beta$  durchgeführt. HA-PIASy wurde bakteriell exprimiert und mit GST-C/EBP $\beta$  bzw. His-Lef1 Proteinen inkubiert. Abb. 3.29 zeigt das Ergebnis dieser Interaktionsstudie. PIASy nicht in der Lage, SUMO-modifiziertes oder unmodifiziertes C/EBP $\beta$  zu binden. Unter diesen Bedingungen hingegen geht Lef1 eine Assoziation mit PIASy ein. Die Bindung zwischen PIAS3 und C/EBP $\beta$  ist demnach spezifisch.

PIASy besitzt im Vergleich zu PIAS3 kein SUMO-bindendes Motiv und hat einen verkürzten C-Terminus. Diese Regionen in PIAS3 sind vermutlich mit verantwortlich für die Interaktion zwischen C/EBP $\beta$  und PIAS3.



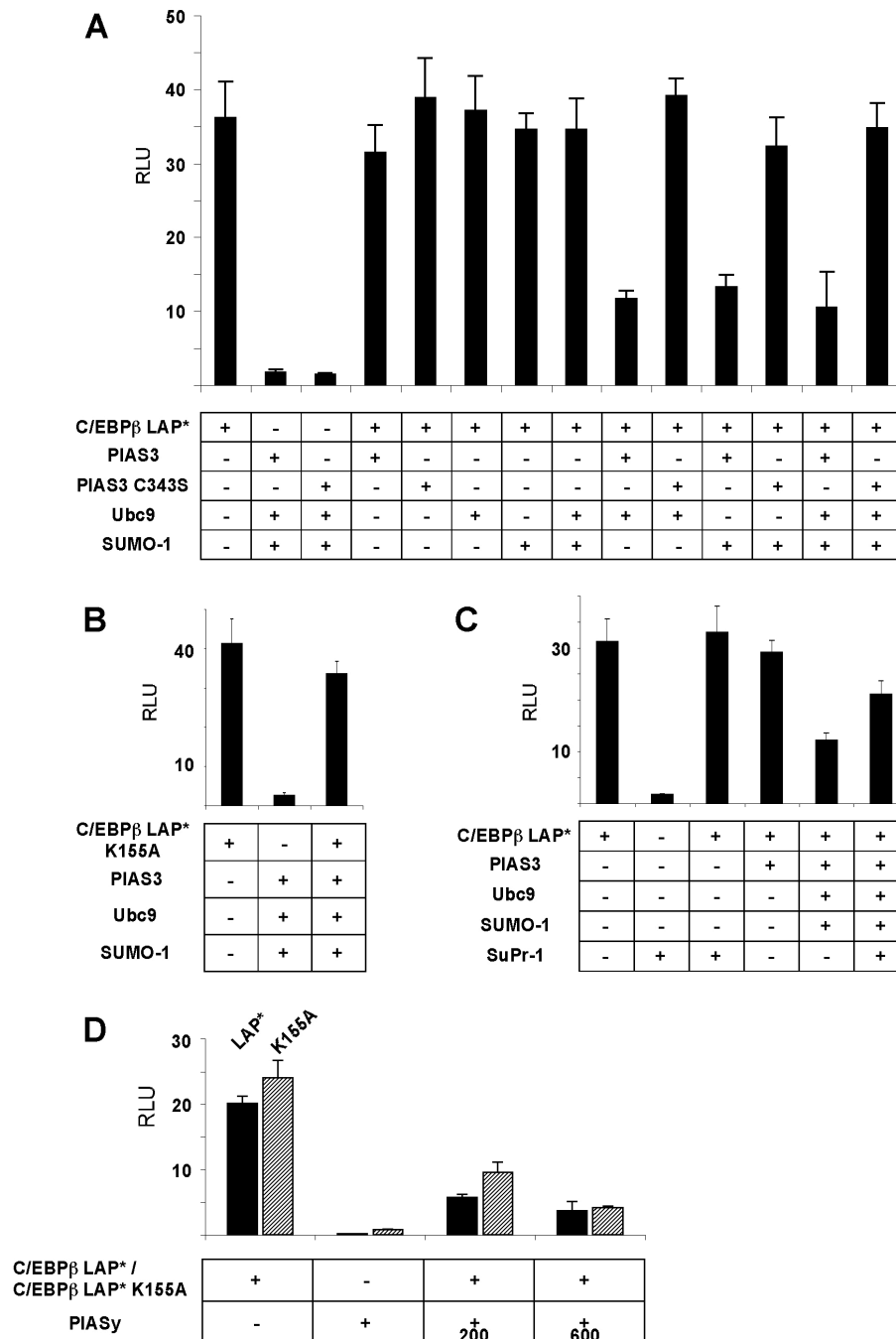
**Abb. 3.29: PIASy zeigt keine Bindung an C/EBP $\beta$ .** Bindungsstudie zwischen HA-PIASy und GST-C/EBP $\beta$  bzw. His-Lef1. 3  $\mu$ g GST-Fusionsproteine bzw. His-Lef1 wurden an Glutathion-Sepharose (input GST-Proteine) bzw. an Nickel-NTA-Sepharose (input His-Lef1) gebunden. Die Sterne (\*) zeigen die relevanten Fusionsproteine. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit Lysaten von bakteriell exprimiertem HA-PIASy inkubiert. Nach häufigem Waschen wurden die Proben auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Gebundene Proteine wurden mittels Immunoblot (IB) mit anti-HA Antikörper detektiert.

### 3.6.6 PIAS3 ist ein SUMO-abhängiger C/EBP $\beta$ Repressor

Die Interaktion zwischen C/EBP $\beta$  und PIAS3 legt eine mögliche Rolle von PIAS3 bei der Regulation der C/EBP $\beta$ -Aktivität nahe. Um den Einfluß von PIAS3 auf die C/EBP $\beta$ -abhängige Transkription zu untersuchen, wurden Reportergerienstudien mit dem bereits im Kap. 3.4.3 eingeführten Luciferase-Reporterkonstrukt pM82 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.30 A-D zusammengefasst. Koexpression von Ubc9 und/oder SUMO-1 hatte keinen Einfluß auf die Aktivität des Transkriptionsfak-

tors. Weder PIAS3 noch PIAS3 C343S war in der Lage, einen Einfluß auf die transkriptionellen Eigenschaften von C/EBP $\beta$  auszuüben. Wurde nun jedoch SUMO-1 und/oder Ubc9 zusammen mit PIAS3 exprimiert, so konnte eine Repression des Transkriptionsfaktors beobachtet werden. Die Aktivität des Transkriptionsfaktors war dabei etwa um den Faktor vier im Vergleich zur Kontrolle gemindert. Im Gegensatz dazu konnte die katalytisch inaktive Mutante PIAS3 C343S diese Repression bei gleichzeitiger Koexpression der Komponenten der SUMOylierungsmaschinerie nicht bewirken. Im Abbildungsteil B wurde der Einfluß von PIAS3 auf ein nicht-SUMOylierbares C/EBP $\beta$  Protein mit einer Mutation an der SUMO-Akzeptorposition (K155A) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass ein Verlust der SUMOylierbarkeit von C/EBP $\beta$  mit einem Verlust der repressiven Eigenschaft von PIAS3 einhergeht. Abbildungsteil C zeigt, dass der repressive Effekt von PIAS3 durch die Abschaffung der SUMOylierung durch Koexpression der Isopeptidase SuPr-1 zum Teil aufgehoben werden kann. Abbildung D zeigt darüber hinaus, dass die Koexpression von PIASy zu einer starken Repression der transkriptionellen Aktivität von C/EBP $\beta$  führt. Dies konnte sowohl für LAP\* als auch für die nicht-SUMOylierbare LAP\* K155A-Mutante gezeigt werden. Die Repression durch PIASy ist demnach nicht von der SUMOylierbarkeit von C/EBP $\beta$  abhängig und scheint nach einem anderen Mechanismus zu funktionieren als die Repression durch PIAS3. Da eine Interaktion von PIASy und C/EBP $\beta$  nicht beobachtet werden konnte (siehe Abb. 3.29), könnte die Induktion von Seneszenz durch PIASy eine mögliche Erklärung für die Repression sein (Bischof *et al.*, 2006).

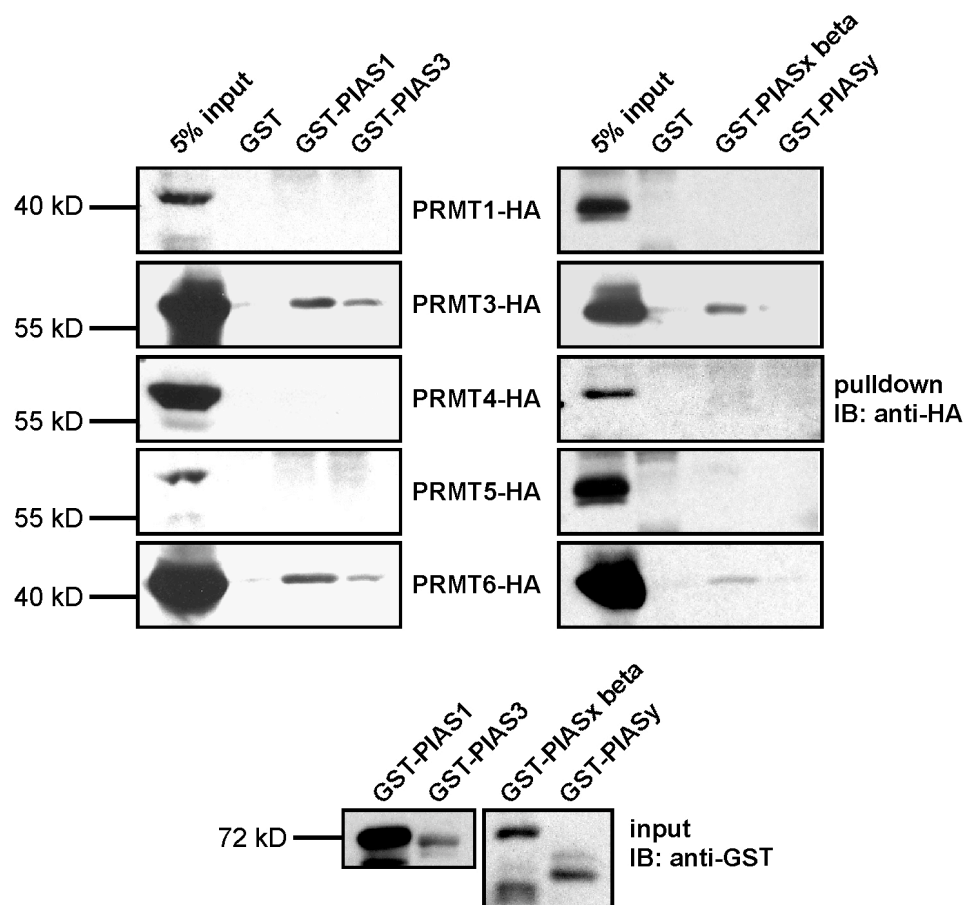
Zusammenfassend lässt sich aus diesen Experimenten schließen, dass die SUMOylierung des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  eine notwendige Voraussetzung für die Repression durch PIAS3 darstellt.



**Abb. 3.30: PIAS3 ist ein SUMOylierungs-abhängiger Repressor von C/EBP $\beta$ .** (A) pcDM8-C/EBP $\beta$  LAP\*, pcDNA3-HA-PIAS3 bzw. pcDNA3-HA-PIAS3 C343S, pcDNA3-HA-Ubc9 und pcDNA3-HA-SUMO-1 wurden zusammen mit dem Luciferase-Reportergenkonstrukt pM82 transient in HEK-293 Zellen transfiziert. Für die Normalisierung der Lichteinheiten gegen die Transfektionseffizienz wurden gleiche Mengen pCMV- $\beta$ -Galactosidase kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lichteinheiten wie Kap. 2.2.5 beschrieben gemessen. (B) Wie (A), nur das die nicht-SUMOylierbare Mutante von C/EBP $\beta$  transfiziert wurde (pcDM8-C/EBP $\beta$  LAP\* K155A). (C) Wie (A), nur das die SUMO-spezifische Isopeptidase SuPr-1 (pcDNA3-HA-SuPr-1) kotransfiziert wurde. (D) Wie (A), nur das steigende Mengen an pcDNA3-HA-PIASy kotransfiziert wurden. RLU: Relative light units.

### 3.6.7 PIAS-Proteine rekrutieren Arginin-Methyltransferasen

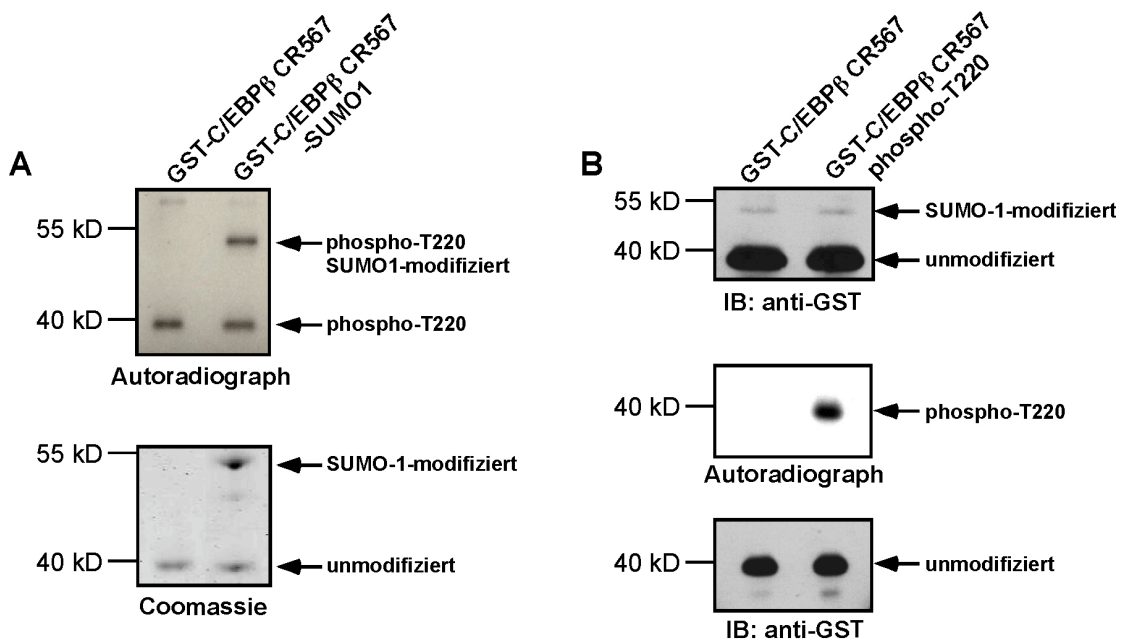
Um die Repression von C/EBP $\beta$  durch PIAS3 zu verstehen, wurden Interaktionspartner gesucht, welche diese repressiven Eigenschaften vermitteln können. Proteine, die einen repressiven Effekt auf C/EBP $\beta$  haben sind beispielsweise Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) (Kowenz-Leutz und Leutz, unpubliziert). Es wurden Interaktionsstudien durchgeführt, um zu ermitteln, ob und welche PRMTs durch welche PIAS-Proteine gebunden werden können. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.31 zusammengefasst. Dabei wurde deutlich, dass PIAS1, PIAS3 und PIASx beta in der Lage sind, mit PRMT3 und 6 zu interagieren. PIASy ist dazu nicht in der Lage. Die PRMTs 1, 4 und 5 zeigen keine Interaktionen mit Mitgliedern der PIAS-Familie.



**Abb. 3.31: PIAS-Proteine können Protein-Arginin-Methyltransferasen binden.** Bindungsstudie zwischen GST-PIAS1, -PIAS3, -PIASx beta und -PIASy und verschiedenen PRMTs. 3  $\mu$ g GST-Fusionsproteine wurden an Glutathion-Sepharose (input GST-Proteine) gebunden. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit Lysaten von in HEK-293 Zellen exprimierten HA-PRMT Fusionsproteinen inkubiert. Nach häufigem Waschen wurden die Proben auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Gebundene Proteine wurden mittels Immunoblot (IB) mit anti-HA Antikörper detektiert.

### 3.6.8 SUMOylierung und Phosphorylierung von C/EBP $\beta$ CR567 sind *in vitro* unabhängig voneinander

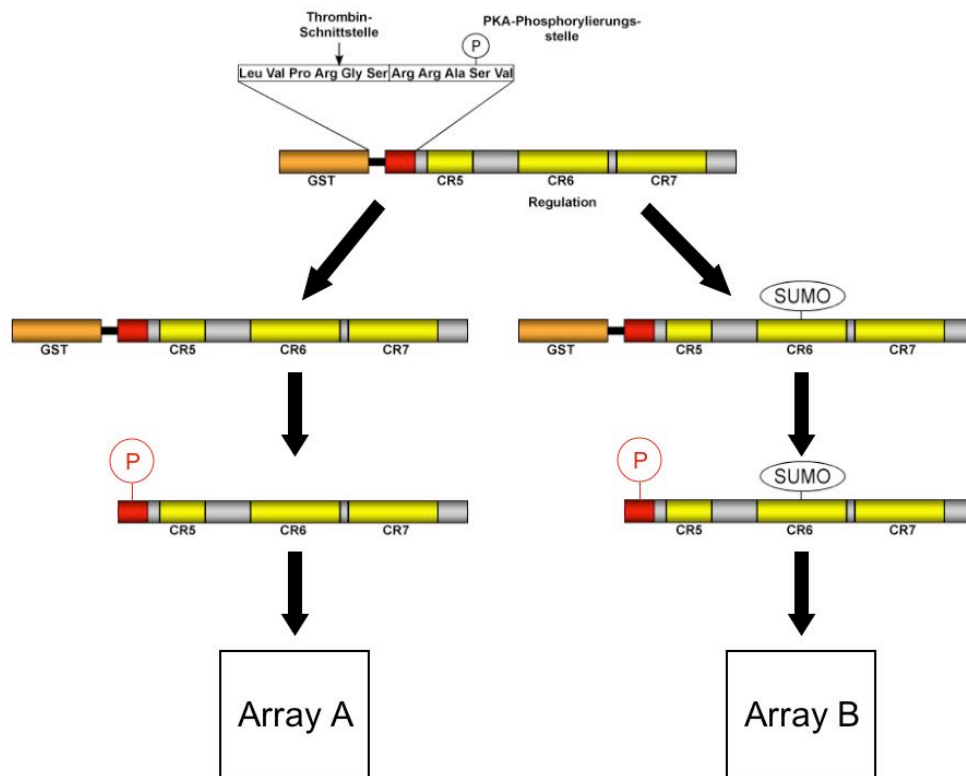
SUMOylierung von C/EBP $\beta$  wirkt sich repressiv auf das Verhalten des Transkriptionsfaktors aus (siehe Kap. 3.6.6). Phosphorylierung über die MAPK-Signaltransduktionskaskade führt zu einer Aktivierung des Proteins. Aus diesen Gründen könnte eine Abhängigkeit dieser posttranslationalen Modifikationen möglich sein, z. B. eine Abnahme der SUMOylierung nach Phosphorylierung durch Erk1 oder eine Abnahme der Phosphorylierung an T220 bei vorhandener SUMOylierung. Um die Abhängigkeit dieser posttranslationalen Modifikationen auf C/EBP $\beta$  zu testen, wurden sequenzielle Phosphorylierungs- und SUMOylierungsreaktionen *in vitro* durchgeführt. Die Ergebnisse der Studien sind in Abb. 3.32 zusammengefasst. Abb. 3.32 A zeigt, dass C/EBP $\beta$  in SUMOylierter oder unmodifizierter Form in gleichem Maße durch Erk1 phosphoryliert werden kann. Wird die Phosphorylierungsreaktion zuerst durchgeführt, wie in Abbildungsteil 3.32 B dargestellt, und erfolgt anschließend die SUMO-1-Konjugation *in vitro*, so ist auch hier kein Unterschied zwischen den beiden Substraten zu erkennen. Eine Abhängigkeit von SUMOylierung und Phosphorylierung kann nach diesen Experimenten also nicht abgeleitet werden. Einschränkend ist jedoch festzustellen, dass nicht das vollständige Protein eingesetzt wurde, sondern nur die regulatorische Region von C/EBP $\beta$ . Es könnten demnach andere Teile des Proteins einen Einfluß auf sequenzielle posttranslationale Modifikationen haben.



**Abb. 3.32: Keine Abhängigkeit der SUMOylierung und Phosphorylierung von C/EBP $\beta$  CR567 *in vitro*.** (A) GST-C/EBP $\beta$  CR567 wurde in Bakterien exprimiert und SUMOyliert und über Glutathion-Sepharose gereinigt. Gleiche Mengen modifiziertes und unmodifiziertes Protein wurden in eine *in vitro* Phosphorylierungsreaktion mit rekombinantem Erk1 und  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP eingesetzt. Der untere Teil von Abb. (A) zeigt den Input der Proteine nach SDS-PAGE und Coomassiefärbung, der obere Teil zeigt das Ergebnis nach der Phosphorylierungsreaktion, SDS-PAGE und Autoradiographie für 2 h. (B) In einem zu (A) reziproken Experiment wurde GST-C/EBP $\beta$  CR567 einer *in vitro* Phosphorylierungsreaktion unterworfen und anschließend wurden phosphorylierte und unphosphorylierte Proteine *in vitro* SUMOyliert. GST-Fusionsproteine wurden durch Immunoblot (IB) mit einem anti-GST Antikörper detektiert.

### 3.7 Detektion von Interaktionspartnern auf Protein-Macroarrays mit radioaktiv markierten Proteinsonden der C/EBP $\beta$ RD in SUMO-1-modifizierter und unmodifizierter Form

Die unter 3.2 beschriebene Methode für die Identifikation von Bindungspartnern der TAD von C/EBP $\beta$  mit Hilfe von Protein-Macroarrays wurde in einem zweiten experimentellen Ansatz für die Detektion von Interaktionspartnern der regulatorischen Region verwendet. Dabei sollte vor allem untersucht werden, ob die Konjugation von SUMO-Spezies einen Einfluß auf das Bindungsverhalten von Interaktionspartnern hat. Für PIAS3 konnte eine SUMO-abhängige Bindung an C/EBP $\beta$  bereits gezeigt werden (siehe Kap. 3.6). Für diese erneute Hybridisierung wurden zwei identische Protein-Macroarrays verwendet. Das eine Macroarray wurde mit der unmodifizierten Form der regulatorischen Region, das andere mit der SUMO-modifizierten regulatorischen Region von C/EBP $\beta$  in einem Parallelansatz hybridisiert. Dabei zeigte sich, dass bestimmte Proteine ausschließlich von unmodifiziertem CR567, andere von CR567 und CR567-SUMO-1 in gleichem Maße und wiederum andere nur von CR567-SUMO-1 gebunden werden konnten.



**Abb. 3.33: Schematische Darstellung der parallelen Hybridisierung zweier Protein Macroarrays mit der PKA-C/EBP $\beta$  CR567 Proteinsonde in ihrer SUMOylierten und nicht-SUMOylierten Form.** Die N-terminal gelegene Region (orange) zeigt den GST-Anteil des Proteins. Der schwarze Balken enthält die Thrombinschnittstelle und die rote Region enthält die PKA-Phosphoakzeptorsequenz. Die Thrombin Protease hydrolysiert die Bindung zwischen Arginin und Glycin. PKA phosphoryliert spezifisch das Serin in der Phosphoakzeptorsequenz. Graue und gelbe Bereiche bilden die regulatorische Region von C/EBP $\beta$  (CR5, 6 und 7), wobei graue Bereiche weniger stark konserviert sind und gelbe Bereiche einen hohen Grad an Konservierung zwischen verschiedenen Spezies und anderen Mitgliedern der C/EBP $\beta$ -Familie zeigen. CR6 enthält eine SUMO-Akzeptorsequenz. CR: „conserved region“, konservierte Region.

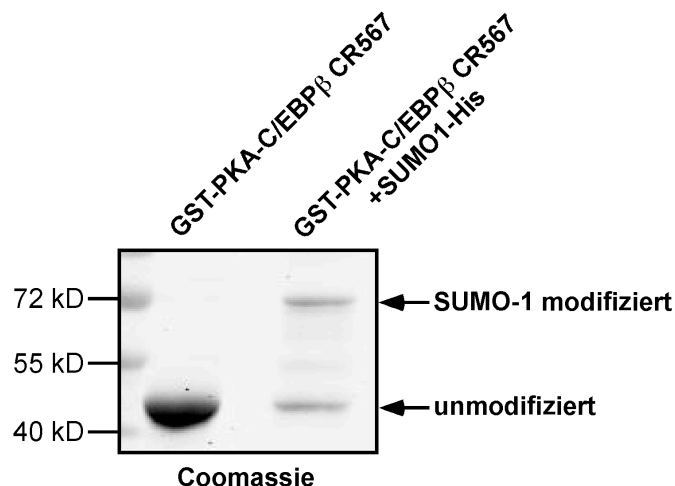
### 3.7.1 Generierung einer SUMO-1-modifizierten Proteinsonde aus der RD (CR567) von C/EBP $\beta$

Der Prozess der SUMOylierung ist in Zellen einer großen Dynamik unterworfen. In eukaryotischen Zellen liegt nur ein Bruchteil des Gesamtproteins in SUMO-modifizierter Form vor. Beim Aufschluss der Zellen kommt es außerdem zu einem Abspalten der SUMO-Proteine durch Isopeptidasen. Daher ist es sehr schwierig, SUMOyliertes Protein in reiner Form aus eukaryotischen Zellen zu gewinnen.

Eine weitere Möglichkeit der Generierung SUMO-modifizierter Proteine ist die *in vitro* SUMOylierung. Diese erfordert jedoch die Aufreinigung aktiver Proteine der gesamten Enzymkaskade (Pichler *et al.*, 2002). Die Ausbeuten an aktiven Enzymen sind dabei häufig sehr gering. Es wurde deshalb ein System zur SUMOylierung von Proteinen in *E. coli* verwendet (Mencia und de Lorenzo, 2004), welches von M. Knoblich im Labor etabliert wurde. Dieses erlaubt eine Generierung von SUMO-modifizierten GST-Fusionsproteinen in großen Mengen, welche mittels Affinitäts-Chromatographie aus dem *E. coli*-Extrakt aufgereinigt werden können. Die gereinigten Proteine unterscheiden sich damit von N- bzw. C-terminalen SUMO-Fusionskonstrukten, welche nicht dem physiologisch prozessierten Protein entsprechen.

Ein minimales System zur SUMOylierung besteht aus Plasmiden, welche für His-SUMO-1, Aos1, Uba2, Ubc9 und das Zielprotein kodieren. Koexpression dieser Komponenten führt zur Substrat-spezifischen SUMOylierung des Proteins während der Expression in *E. coli*.

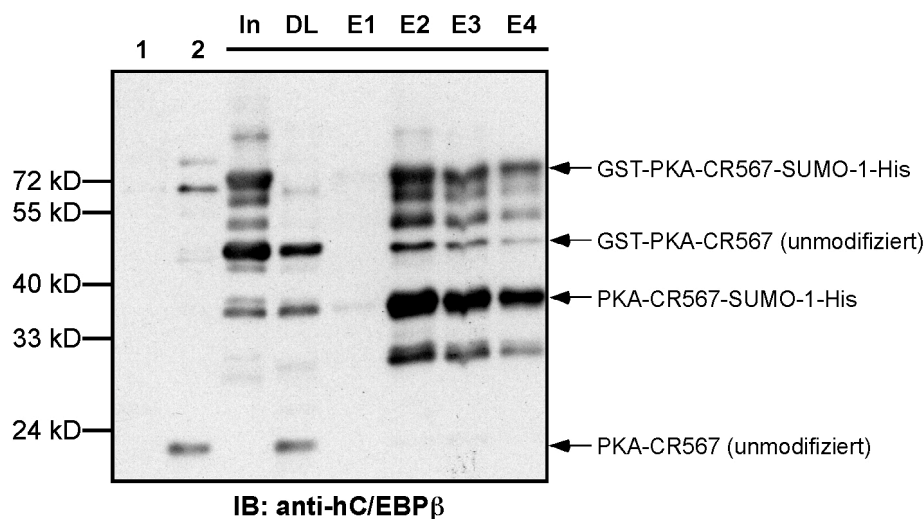
Abb. 3.34 zeigt die Produkte der bakteriellen SUMOylierung der regulatorischen Region CR567 von humanem C/EBP $\beta$  nach Glutathion-S-Transferase Affinitätsaufreinigung. Spur 1 zeigt GST-CR567 ohne Koexpression der SUMOylierungsmaschinerie. Durch Koexpression von Komponenten der SUMO-Enzymkaskade wird GST-CR567 effizient SUMOyliert (siehe Spur 2). Dieses SUMOylierte Substrat kann nun durch nachfolgende Ni-NTA-Affinität unter Verwendung des His-Epitops an SUMO-1 weiter angereichert werden.



**Abb. 3.34: SUMOylierung von C/EBP $\beta$  CR567 in *E. coli*.** Expression und Affinitätsaufreinigung von unmodifizierten und His-SUMO-1-modifizierten GST-C/EBP $\beta$  CR567 Fusionsproteinen. Spur 1 zeigt das unmodifizierte GST-PKA-C/EBP $\beta$  CR567 Fusionsprotein, Spur 2 das His-SUMO-1 modifizierte Protein nach Glutathion-S-Transferase Affinitätschromatographie. Von dem jeweiligen Eluat wurden 3  $\mu$ g mit einem SDS-Polyacrylamidgel getrennt und mit Coomassie-Färbelösung angefärbt.



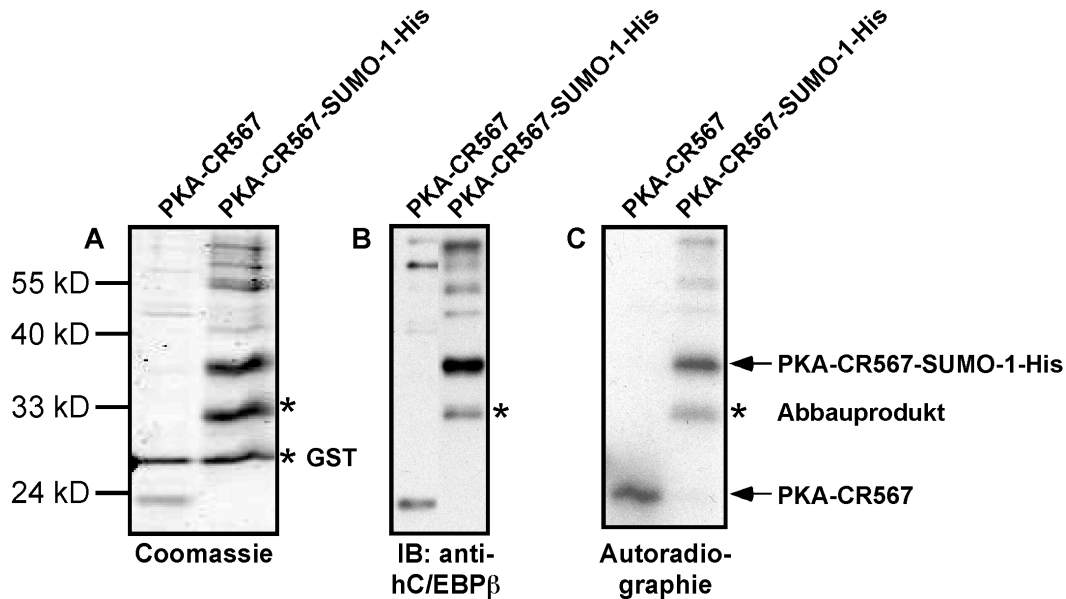
Die Hybridisierung des Protein-Makroarrays erfolgte erneut ohne den GST-Anteil des Fusionsproteins um falsch-positive Interaktionen zu vermeiden. Der GST-Teil wurde dazu proteolytisch mit Thrombin abgespalten und abgetrennt. Darüber hinaus ist es für die nachfolgende vergleichende Hybridisierung der Protein-Macroarrays wichtig, die SUMOylierte Form von der nicht-SUMOylierten Form chromatographisch zu separieren. Abb. 3.35 zeigt die Spaltprodukte der GST-PKA-C/EBP $\beta$  CR567 Fusionsproteine nach Thrombin-Hydrolyse und die Abtrennung der SUMO-modifizierten von der nicht-modifizierten Form. In Spur 1 wurde gespaltenes GST-PKA-Protein als Kontrolle geladen, Spur 2 zeigt den abgespaltenen PKA-CR567-Anteil des GST-C/EBP $\beta$  Fusionsproteins. Spur 3 (In) zeigt SUMOyliertes GST-PKA-CR567 Fusionsprotein. Von diesem wurde der GST-Anteil abgespalten und Nickel-NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt. Durch das His-Epitop an SUMO-1 konnten SUMOylierte Proteine angereichert werden. Spur 4 enthält den Durchlauf (DL), welcher vor allem nicht-SUMOyliertes GST-PKA-CR567 und das PKA-CR567 Spaltprodukt enthält. Nach Elution mit Imidazol-haltigem Puffer wurden die Elutionsfraktionen E1 bis E4 gewonnen und aufgetrennt. Fraktion E4 enthielt einen hohen Anteil von PKA-CR567-SUMO-1-His und wurde für die nachfolgenden Experimente benutzt. Durch eine Kombination von Thrombin-Spaltung und Ni-NTA-Affinität konnten somit PKA-C/EBP $\beta$  CR567 und PKA-C/EBP $\beta$  CR567-SUMO-1 voneinander getrennt werden.



**Abb. 3.35: Präparation von unmodifizierten und SUMO-modifizierten PKA-C/EBP $\beta$  CR567 Fusionsproteinen.** Spur 1: Spaltung von GST-PKA mit Thrombin. Spur 2: Spaltung von GST-PKA-C/EBP $\beta$  CR567 mit Thrombin. Spur 3 zeigt den Input (In) für die nachfolgende Thrombin-Spaltung und Affinitätsaufreinigung. Auf das SDS-Gel wurde hier eine Mischung aus unmodifiziertem und SUMO-modifiziertem C/EBP $\beta$  CR567 geladen. Diese wurde mit Thrombin gespalten und mit Nickel-NTA-Sepharose inkubiert. Der Durchlauf (DL) dieses Affinitätsschrittes ist in Spur 4 aufgetragen. E1-E4 zeigt die Elutionsfraktionen nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Ca. 5  $\mu$ g der GST-PKA und GST-PKA-CR567 Proteine in SUMOylierter und nicht-SUMOylierter Form wurden in die Thrombin-Spaltungen eingesetzt. Die Detektion der Proteine erfolgte im Immunoblot (IB) mit einem anti-hC/EBP $\beta$ -Antikörper.

Die Proteinsonden wurden nun mit  $^{32}$ P  $\gamma$ -ATP *in vitro* phosphoryliert. Dafür wurden gleiche Mengen PKA-CR567 und PKA-CR567-SUMO-1 in die Reaktionen eingesetzt. Abb. 3.36 A-C zeigt das Ergebnis dieses Ansatzes. Sowohl PKA-CR567 als auch PKA-CR567-SUMO-1 wurden spezifisch *in vitro* phosphoryliert und standen nun für die parallele Hybridisierung der Protein-Macroarrays zur Verfügung.

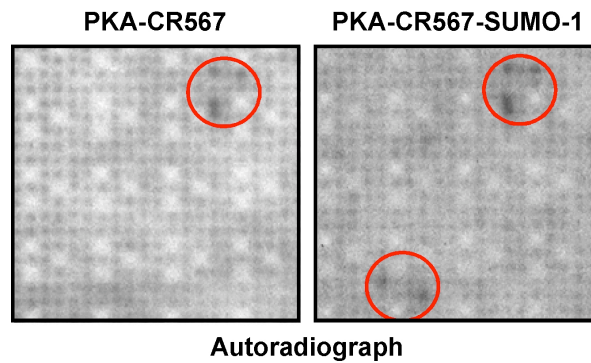




**Abb. 3.36: *In vitro* Phosphorylierung des PKA-C/EBP $\beta$  Fusionsproteins mittels Protein-kinase A.** (A) Gleiche Mengen PKA-CR567 und PKA-CR567-SUMO-1 wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung angefärbt. In beiden Spuren sind Reste von abgespaltenem GST-Protein zu erkennen. (B) Wie unter (A), nur das die Proteine mittels Immunoblot (IB) und anti-hC/EBP $\beta$  Antikörper detektiert wurden. Die Proteinbande bei ca. 33 kD scheint ein Degradationsprodukt von C/EBP $\beta$  zu sein. Die schwächeren Banden im oberen Bereich des Immunoblots scheinen poly-SUMOylierte C/EBP $\beta$ -Substrate zu sein. (C) Wie unter (A) und (B). *In vitro* Phosphorylierung des PKA-C/EBP $\beta$  CR567 Fusionsproteins mit PKA. Ca. 5  $\mu$ g PKA-Fusionsproteine wurden in die Phosphorylierungsreaktion eingesetzt. 1/50 des Reaktionsansatzes wurde auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und radioaktiv markiertes Protein mittels Autoradiographie nachgewiesen.

### 3.7.2 Identifikation von SUMO-1-abhängigen Interaktionspartnern der regulatorischen Domäne von C/EBP $\beta$

Für die parallele Hybridisierung wurden zwei Protein-Macroarrays verwendet, die aus einer humanen Lungen cDNA-Bibliothek generiert wurden (RZPD library no 828: Human Lung Protein Expression Library). Auf diesem Filter sind 24576 Proteine aufgebracht worden (also insgesamt 49152 Proteinspots). Die beiden PVDF-Membranen wurden zeitgleich hybridisiert und nach der Detektion der Signale ausgewertet. Bei der Auswertung wurde schnell deutlich, dass Proteine entweder ausschließlich auf einem der beiden Filter oder an der gleichen Position auf beiden Filtern vorhanden waren. Dies legte die Vermutung nahe, dass Bindungspartner der regulatorischen Region von C/EBP $\beta$  diese entweder in Abhängigkeit oder unabhängig von der SUMOylierung binden können. Beispielhaft ist dies in Abb. 3.37 gezeigt. Die Membran, die mit PKA-CR567 hybridisiert wurde, zeigt nur die zwei Interaktionen in der oberen rechten Ecke. Die mit PKA-CR567-SUMO-1 hybridisierte Membran zeigt neben den zwei Interaktionen ein weiteres interagierendes Protein im unteren linken Bereich des gezeigten Ausschnitts. Tab. 3.3 (Anhang) zeigt die 53 identifizierten Bindungspartner der PKA-C/EBP $\beta$  CR567 Proteinsonde in ihrer nicht-SUMOylierten Form. Tab. 3.4 (Anhang) enthält 40 Interaktionspartner der PKA-C/EBP $\beta$  CR567 Proteinsonde in ihrer SUMOylierten und nicht-SUMOylierten Form und Tab. 3.5 führt die 35 Interaktionspartner der PKA-C/EBP $\beta$  CR567 Proteinsonde in ihrer SUMOylierten Form auf.



**Abb. 3.37: Parallele Hybridisierung zweier Protein-Macroarrays.** Die Membranen wurden zeitgleich mit gleichen Mengen PKA-CR567 bzw. PKA-CR567-SUMO-1 hybridisiert und für eine Woche exponiert. Die Auswertung der Filme erfolgte wie bereits beschrieben (siehe Kap. 2.2.4.4).

### 3.7.3 Auswahl von Interaktionspartnern der C/EBP $\beta$ RD

Es konnten also drei unterschiedliche Gruppen von interagierenden Proteinen identifiziert werden. Zur ersten Gruppe zählen Proteine, die ausschließlich die unmodifizierte RD binden können. In der zweiten Gruppe befinden sich Proteine, die unabhängig von SUMOylierung an der gleichen Position auf den zwei Macroarrays gebunden wurden und die dritte Gruppe enthält ausschließlich CR567-SUMO-1-bindende Interaktionspartner. In Tab. 3.6 wurden die interessantesten Proteine ausgewählt und ihrem jeweiligen Interaktionspartner zugeordnet. Die Funktion der Proteine ist recht unterschiedlich und wird im Diskussionsteil ausführlich erörtert (siehe Kap. 4.6).

Nr.	Beschreibung nach UniGene Datenbank
<b>Interaktion mit CR567</b>	
19	cDNA FLJ23797 fis, clone HEP22157, highly similar to nuclear zinc finger protein Np95 (UHRF1)
34	Methyl-CpG binding domain protein 1 (MBD1), transcript variant 1
35	Methyl-CpG binding domain protein 6 (MBD6)
38	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2 (MLL2)
53	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (MYC)
<b>Interaktion mit CR567 oder CR567-SUMO1</b>	
18	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A), transcript variant 2
<b>Interaktion mit CR567-SUMO1</b>	
6	Breakpoint cluster region (BCR), transcript variant 1
8	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2 (CITED2)
32	SRY (sex determining region Y)-box 4 (SOX4)

**Tab. 3.6: Ausgewählte Interaktionspartner der PKA-C/EBP $\beta$  CR567 Proteinsonde in ihrer SUMOylierten oder nicht-SUMOylierten Form.** Die Tabelle zeigt die neun wichtigsten Interaktionspartner, welche an die unmodifizierte oder SUMO-modifizierte regulatorische Domäne von C/EBP $\beta$  binden.

## 4. Diskussion

Die Aktivität der Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  bei der Expression von Genen wird durch verschiedene Kofaktoren verändert. Die Identifikation und Charakterisierung dieser Proteine ermöglicht Rückschlüsse auf die Funktion von C/EBP $\beta$  bei Wachstum, Differenzierung und Homöostase in unterschiedlichen Organsystemen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden wichtige neue Bindungspartner der transaktivierenden Region und der regulatorischen Domäne von C/EBP $\beta$  in ihrer SUMOylierten und nicht-SUMOylierten Form identifiziert und die Funktion dieser assoziierten Proteine zum Teil entschlüsselt. Es konnte gezeigt werden, dass die Lysin-Methyltransferase G9a/H3-K9-HMTase 3 für die Methylierung von C/EBP $\beta$  verantwortlich ist und dass diese Modifikation zur Repression des Transkriptionsfaktors führt. Darüber hinaus konnte ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem Notch-Signalweg und C/EBP $\beta$  aufgedeckt werden. Zudem wurde der Mechanismus zur SUMOylierung von C/EBP $\beta$  und der Bindung der SUMO E3-Ligase PIAS3 teilweise aufgeklärt.

### 4.1 Tandem affinity purification führte nicht zur Identifikation von neuen Interaktionspartnern

Zur Identifikation von Bestandteilen biologischer Komplexe ist ein hoher Reinheitsgrad der Präparation erforderlich. Die tandem affinity purification (TAP) wurde 1999 erstmalig beschrieben und führte zur Aufreinigung makromolekularer Komplexe unter nativen Bedingungen (Rigaut *et al.*, 1999). Die TAP-Strategie wurde in dieser Arbeit verwendet, um C/EBP $\beta$ -assoziierte Proteinkomplexe zu isolieren und nachfolgend zu identifizieren. Ein mit einem TAP-tag versehenes C/EBP $\beta$  konnte über zwei Affinitätsschritte aus verschiedenen Zelllinien aufgereinigt und assoziierte Proteine visualisiert werden. Die nachfolgende Identifikation der Proteine durch massenspektrometrische Untersuchungen gelang jedoch nicht (siehe auch Kap. 3.1.2).

Die TAP-Methode wurde zuerst in Hefen erfolgreich durchgeführt (Rigaut *et al.*, 1999). In diesem Organismus können leicht große Mengen Ausgangsmaterial gewonnen werden. Darüber hinaus kann man sich die hohe Effizienz der homologen Rekombination nutzbar machen. Durch sie ist ein Austausch des zu untersuchenden Gens durch eine mit einem TAP-Epitop markierte Variante leicht möglich. Die Genexpression findet dann auf dem physiologischen Niveau statt. In eukaryotischen Zellen ist dies schwieriger zu erreichen, z. B. durch die Generierung transgener Mäuse. Eine weitere Schwierigkeit der Methode ist die Aufreinigung regulatorischer Proteine, die Kernprozesse wie Wachstum und Differenzierung steuern. Diese werden meist durch unterschiedliche zelluläre Kontrollen in ihrer Menge beschränkt und sind bei der Aufreinigung durch eine große Menge struktureller Proteine oder metabolischer Enzyme überlagert. Darüber hinaus eignet sich die Methode nicht zur Detektion transienter Interaktionen oder Interaktionen, die nur in speziellen physiologischen Zuständen existieren. Das TAP-tag hat ein relativ großes Molekulargewicht von ca. 20 kD, welches zur Bildung artifizieller Proteinkomplexe führen kann (Gavin *et al.*, 2002). Ein weiteres Problem scheint die Detektion kleiner Proteine unter 15 kD zu sein (Gavin *et al.*, 2002).

Die letzten Versuche zur TAP-Affinitätsreinigung von C/EBP $\beta$ -assoziierten Proteinkomplexen wurden Anfang 2004 durchgeführt. Mittlerweile stehen am MDC deutlich sensitivere Massenspektrometer zur Verfügung, die eine erfolgreiche Durchführung der Methode ermöglichen könnten.

## 4.2 Identifikation von neuen Interaktionspartnern auf Protein-Macroarrays

Da die TAP-Methode nicht zur Identifikation unbekannter interagierender Komplexe geführt hat, wurde eine andere Methode gesucht, mit der Interaktionspartner in einem genomischen Kontext gefunden werden können. Es wurde ein Verfahren gewählt, bei dem durch Verwendung radioaktiv markierter Proteinsonden auf Protein-Macroarrays cDNAs von verschiedenen Proteinen, die mit C/EBP $\beta$  interagieren, identifiziert und isoliert werden können. Dabei zeigte sich, dass die Methode auch für die Identifikation von Interaktionspartnern einzelner Domänen oder posttranslational modifizierter Bereiche verwendet werden kann. Die Protein-Protein-Interaktionen besitzen in den meisten Fällen eine viel geringere Affinität als beispielsweise Antigen-Antikörper-Interaktionen und erfordern deshalb sensitivere Detektionsmethoden (z. B. Radioaktivität).

Die Tatsache, dass theoretisch nur 1/6 der aufgebrachten Klone über ein korrektes Leseraster und die richtige Orientierung für die Generierung eines natürlich vorkommenden Proteins verfügt, macht eine hohe Komplexität der Bibliothek von mindestens  $10^6$  erforderlich (Bussow *et al.*, 1998). Für die Experimente wurden entweder eine Human Colon Protein Expression Library mit 18432 Proteinen/Array oder eine Human Lung Protein Expression Library mit 24576 Proteinen/Array verwendet. Die Anzahl der korrekten Proteine liegt demnach bei 3000-4000 pro Membran. Dies ist ein Bruchteil der tatsächlich exprimierten Proteine einer Zelle. Geht man von ca. 30000 menschlichen Genen und folglich Genprodukten aus, so können mit dieser Methode nur ca. 10% der tatsächlich existierenden Interaktionen detektiert werden. Realistischerweise wird von jedem Gen jedoch nicht nur ein Protein synthetisiert, sondern es existieren unterschiedliche Isoformen, posttranslational modifizierte Formen usw., welche die Komplexität des Proteoms deutlich erhöhen. Optimalerweise müssten also sehr viel mehr Membranen verwendet werden oder Membranen, auf denen alle Genprodukte zumindest einmal korrekt aufgebracht worden sind. Die Identifikation aller physiologischen Interaktionspartner von C/EBP $\beta$  wird auf diesem Wege nicht erreicht und erfordert den Einsatz weiterer Screening-Technologien.

Ein großer Vorteil der Technologie im Vergleich zu anderen (z. B.  $\lambda$ gt11 Bibliotheken (Young und Davis, 1983)) ist die Verbindung zwischen DNA-Sequenzinformation und Proteinexpression als eine Ressource für die Zukunft. Unbekannte Genprodukte, die auf dem Protein-Macroarray identifiziert wurden, können zu einem späteren Zeitpunkt im Falle einer Annotation erste funktionelle Daten zu dem entsprechenden Protein liefern.

Eine Alternative zur Expression der cDNA-Bibliothek in *E. coli* wäre die Proteinexpression in Insektenzellen mit Hilfe des Baculovirus-Systems oder in Säugerzellen. Dies würde die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass die aufgetüpfelten eukaryotischen Proteine ihre korrekte Konformation und die richtigen posttranslationalen Modifikationen (proteolytische Prozessierung, Phosphorylierung, Glykosylierung usw.) für die Interaktion mit der Proteinsonde besitzen. In Hefen oder Bakterien können sich die Modifikationen unterscheiden und dadurch Bindungen nicht nachweisbar sein.

Die für diese Arbeit verwendete Methode zur Identifikation von proteom-weiten Interaktionspartnern hat eine Reihe von Vorteilen im Vergleich zu konventionellen Screening-Methoden wie beispielsweise dem Hefe-Zwei-Hybrid-System (Yeast 2-hybrid-System). Zum einen können Proteinsonden flexibler gewählt werden. Es können zum Beispiel Domänen mit transaktivierenden Eigenschaften verwendet werden, was im Hefe-Zwei-Hybrid-System nicht möglich ist. Dies wurde beispielhaft für die C/EBP $\beta$  TAD gezeigt. Zum anderen können rekombinante Proteinsonden gezielt posttranslational modifiziert werden und somit der Einfluß der Modifikation auf Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit mit der SU-

MOylierten und der nicht-SUMOylierten Form der regulatorischen Region von C/EBP $\beta$  gezeigt. Für zukünftige Anwendungen der Technologie könnte C/EBP $\beta$  in phosphorylierter, methylierter oder acetylierter Form auf Protein-Microarrays gegeben werden und Interaktionspartner in Abhängigkeit von posttranslationalen Modifikationen identifiziert werden.

### 4.3 Neue Interaktionspartner der C/EBP $\beta$ TAD

Es folgt eine kurze Beschreibung der mit der C/EBP $\beta$  TAD gefundenen Interaktionspartner und eine Zusammenfassung der Daten, die für das jeweilige Protein in Zusammenhang mit C/EBP $\beta$  zur Verfügung stehen.

#### 4.3.1 Mitglieder der Polycomb-Familie

Als Mitglieder der Polycomb-Familie konnten die Proteine Chromatin-modifying protein 1a, CBX2 und L(3)MBT identifiziert werden. Sie sind in Tab. 4.1 zusammengefasst.

Nr.	Beschreibung nach UniGene Datenbank	Familie	Funktion
39	Chromatin-modifying protein 1a	Polycomb	PRC-1 Komplex assoziiert
40	Chromobox homolog 2 (Pc class homolog, Drosophila) (CBX2)	Polycomb	Polycomb group Protein (PcG), Bestandteil des PRC1-Komplexes
68	Lethal(3)malignant brain tumor-like protein (L(3)MBT)	Polycomb	Polycomb group Protein (PcG)

**Tab. 4.1: Interaktionspartner der C/EBP $\beta$  TAD - Polycomb-Familie.** Die Tabelle zeigt drei Interaktionspartner, die zur Polycomb-Familie gehören oder damit funktionell assoziiert sind.

#### **CBX2/hPc1 und Chromatin-modifying protein 1a (CHMP1a):**

Polycomb group Proteine (PcG) erhalten den transkriptionell reprimierten Status vieler Gene, vor allem den der Hox-Gene, während der Entwicklung des Organismus (Ringrose und Paro, 2004). PcG Proteine können in Gruppen eingeteilt werden, je nachdem mit welchem multimeren Komplex sie assoziiert sind. Man unterscheidet dabei vor allem die Polycomb repressive complexes 1 und 2 (PRC1 und PRC2), wobei es Hinweise auf weitere PcG-haltige Komplexe gibt. Das Polycomb-Protein CBX2 ist ein Bestandteil des Chromatin-assoziierten PRC1-Komplexes. Als Kernkomponenten gelten die Proteine Polycomb (PC), Polyhomeotic (PH), Posterior Sex Combs (PSC) und Sex Combs Extra (SCE). Durch massenspektrometrische Untersuchungen konnten folgende Proteine als Bestandteile des humanen PRC-1-Komplexes identifiziert werden: PCGF2/RNF110, PCGF4/BMI1, CBX2/hPc1/M33, CBX4/hPc2, CBX8/hPc3, PHC1, PHC2, PHC3, SCMH1, RING1 und RNF2/RING2 (Levine *et al.*, 2002). Der PRC1-Komplex bindet die Trimethylierungsmarke an Lysin-27 in Histon H3 über die Chromodomäne der CBX/hPc-Proteine (Fischle *et al.*, 2003; Min *et al.*, 2003). Über sie können PRC1-Komplexe an ihrer jeweiligen Zielgene binden, in welchen die Methylierungsmarke stark verbreitet ist (Schwartz *et al.*, 2006).

PRC1 kann unterschiedliche Funktionen ausüben, vor allem die Remodellierung von Chromatin und die Modifikation von Histonen. Der Komplex katalysiert die Monoubiquitinierung von Histon H2A Lysin-119 und führt damit zu einer Veränderung der Chromatin-Kondensation.

Auffällig ist der funktionelle Zusammenhang zwischen der PRC1-Komponente PCGF4/BMI1 und CHMP1a (siehe Tabelleneintrag Nr. 39). CHMP1a ist am Prozess der Chromosomen-Kondensation beteiligt. Es rekrutiert das Polycomb-Protein PCGF4/BMI1 zu stark kondensierten Bereichen des Chromatins (Stauffer *et al.*, 2001). Eine direkte Bindung zwischen C/EBP $\beta$  und Komponenten des PRC-1-

Komplexes könnte auf eine Beteiligung von C/EBP $\beta$  bei der transkriptionellen Kontrolle von bestimmten Zielgenen durch PcG-Komplexe hindeuten.

#### L(3)MBT:

PcG-Proteine spielen unter anderem eine wichtige Rolle in der Hämatopoiese. Eine Untergruppe von PcG enthalten eine mbt-Domäne, welche zuerst im *Drosophila* lethal(3)malignant brain tumor (l(3)mbt) Protein beschrieben wurde. Das homologe humane l(3)mbt Gen (H-L(3)MBT) ist auf Chromosom 20q12 lokalisiert. Ein Verlust dieses Abschnittes wird mit myeloiden hämatopoietischen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Es könnte also ein Zusammenhang zwischen mbt-haltigen PcG-Proteinen und der Hämatopoiese bestehen. Kürzlich wurde l(3)mbt als Bestandteil von Myb-E2F2/RBF Repressorkomplexen identifiziert (Lewis *et al.*, 2004). Durch die Kollaboration von C/EBP $\beta$  und c-Myb bei der Genaktivierung kann auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen den Transkriptionsfaktoren und dem postulierten Repressorkomplex geschlossen werden. Eine Überexpression von l(3)mbt führt darüber hinaus zur Induktion von mehrkernigen Zellen, was die Vermutung nahelegt, dass l(3)mbt für den korrekten Ablauf der Mitose mitverantwortlich ist. L(3)mbt zeigt keine Kolokalisation mit dem PcG-Protein BMI1. Es ist deshalb vermutlich kein konstitutiver Bestandteil von humanen PRC1-Komplexen. C/EBP $\beta$  könnte demnach in der Lage sein, verschiedene Polycomb-Komplexe zu rekrutieren.

### 4.3.2 Interaktionspartner die auf neue posttranslationale Modifikationen von C/EBP $\beta$ hinweisen

Posttranslationale Modifikationen verändern die Eigenschaften der durch sie modifizierten Proteine. Serin-, Threonin- und Tyrosinreste können phosphoryliert werden. Acetylierung erfolgt an Lysinresten. Methylierung kann an Arginin- und Lysinresten vorkommen, wobei Arginine monomethyliert oder symmetrisch bzw. asymmetrisch dimethyliert und Lysine mono-, di- oder trimethyliert sein können. Ubiquitinierung und SUMOylierung erfolgen an Lysinresten. Jede Modifikation wird durch spezifische Enzyme oder Enzymklassen katalysiert. Nachfolgend sind die Proteine beschrieben, die C/EBP $\beta$  auf verschiedene Arten modifizieren könnten.

Nr.	Beschreibung nach UniGene Datenbank	Familie	Funktion
45	Egl nine homolog 1, SM-20	Posttranslationale Modifikation	Hydroxylase
47	F-box and WD-40 domain protein 5 (FBXW5), transcript variant 2	Posttranslationale Modifikation	Bestandteil des ternären E3-Ubiquitin Ligase Komplexes SCF
59	Histone deacetylase 10 (HDAC10)	Posttranslationale Modifikation	Histon-Deacetylase Typ 2
60	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9 specific 3 (G9a)	Posttranslationale Modifikation	Lysin-Methyltransferase
76	MRG-binding protein, Chromosome 20 open reading frame 20	Posttranslationale Modifikation	Bestandteil des NuA4 Histon-Acetyltransferase Komplexes
107	Serine/threonine-protein kinase Pim-3 oncogene (PIM3)	Posttranslationale Modifikation	Serin/Threonin-Proteinkinase

**Tab. 4.2: Interaktionspartner der C/EBP $\beta$  TAD - posttranslationale Modifikatoren.** Die Tabelle zeigt sechs Interaktionspartner, die den posttranslationalen Modifikatoren zugeordnet werden können. Sie besitzen entweder enzymatische Funktionen oder sind Bestandteile von Multiproteinkomplexen mit enzymatischen Funktionen.

#### Egl-9 homolog1, SM-20:

Der transkriptionale Koaktivator hypoxia-inducible factor alpha (HIF- $\alpha$ ) wirkt als globaler Regulator der zellulären O<sub>2</sub> Homöostasis. Unter nicht-hypoxischen Bedingungen wird HIF- $\alpha$  ubiquitiniert und der proteosomalen Degradationsmaschinerie zugeführt. Dieser Prozess wird unter hypoxischen Bedingungen in der Zelle inhibiert.

Das Enzym Egl-9 homolog 1 katalysiert die Bildung von 4-Hydroxyprolin in HIF- $\alpha$  und markiert somit das Protein für die proteasomale Degradation durch den Hoppel-Lindau Ubiquitinierungskomplex unter normoxischen Bedingungen (Semenza, 2001). HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  werden an verschiedenen Aminosäuren modifiziert und diese

Modifikationen verändern die Interaktion mit Kofaktoren. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Bindung von HIF-1 $\alpha$  an CBP/p300 durch Hydroxylierung eines konservierten Asparaginrestes in HIF-1 $\alpha$  gesteuert wird (Pouyssegur *et al.*, 2006). Die Interaktion zwischen Egl-9 homolog 1 und C/EBP $\beta$  könnte auf eine Hydroxylierung des Transkriptionsfaktors hindeuten.

#### **FBXW5:**

FBXW5 ist ein Bestandteil des ternären E3-Ubiquitin Ligase Komplexes SCF (SKP1-CUL1-F-box protein). Das Protein ist für die Substraterkennung verantwortlich. Der Komplex ist damit in der Lage, die Stabilität verschiedenster Proteine zu beeinflussen und somit unterschiedlichste zelluläre Prozesse zu kontrollieren. Die F-box ist eine ca. 50 Aminosäuren große Domäne, welche der Protein-Protein Interaktion dient. Das F-box Motiv verbindet FBXW5 mit den anderen Komponenten des SCF-Komplexes, vor allem mit der Kernkomponente SKP1. Im carboxy-terminalen Teil des Proteins befinden sich drei WD Motive, die zu weiteren Protein-Protein-Interaktionen in der Lage sind. Sie binden phosphorylierte Substrate an den SCF-Komplex. Der SCF-Komplex könnte somit bei der Ubiquitinierung von C/EBP $\beta$  eine Rolle spielen und damit die Stabilität des Proteins regulieren.

#### **HDAC10:**

Ein weiterer Bindungspartner der transaktivierenden Region von C/EBP $\beta$  ist die Histon-Deacetylase HDAC10. Dabei handelt es sich um eine Histon-Deacetylase vom Typ 2. Dieses Enzym ist für die Deacetylierung von Lysinen an den N-terminal gelegenen Abschnitten der Histone (H2A, H2B, H3 und H4) verantwortlich. Deacetylierung von Histonen führt zu epigenetischer Repression und ist damit für transkriptionelle Regulation, Zellzykluskontrolle und Entscheidungen in Entwicklungsprozessen verantwortlich. Histon-Deacetylasen wirken in großen Multiproteinkomplexen mit einem Gewicht von mehreren Megadalton. HDAC10 ist in der Regel mit HDAC2, HDAC3 und N-CoR2 assoziiert. Die Tatsache, dass die Interaktionen zwischen N-CoR2 und HDAC10 einerseits (Fischer *et al.*, 2002) und zwischen C/EBP $\beta$  und N-CoR2 andererseits (Ki *et al.*, 2005) bereits beschrieben sind, lässt die Vermutung zu, dass die drei Proteine Bestandteile des gleichen repressiven Komplexes sind.

#### **Histon-Lysin N-methyltransferase, H3 Lysin-9 spezifisch 3 / G9a:**

H3-K9-HMTase 3 (G9a) gehört zur Familie SET-Domänen-haltiger Lysin-Methyltransferasen. Diese evolutionär konservierte Domäne umfasst ca. 140 Aminosäuren und wurde ursprünglich in den *Drosophila m.* Proteinen Suppressor of variegation 3-9 (Su(var)3-9), Enhancer-of-zeste (E(z)) und Trithorax (trx) beschrieben. Su(var)3-9 ist ein mit Heterochromatin assoziiertes Protein, welches bei „position effect variegation“ (PEV) eine Rolle spielt. Bei der PEV werden euchromatische Gen-Regionen nach Verlagerung in einen neuen Genlokus in unmittelbare Nähe von konstitutivem Heterochromatin selber heterochromatisiert und damit transkriptionell stillgelegt. E(z) gehört zur Gruppe der Polycomb-Gene, welche für den Erhalt Segment-spezifischer Repression von homöotischen Genen verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu ist trx das namensgebende Gen der Trithorax-Familie, welches für segment-spezifische Aktivierung homöotischer Gene verantwortlich ist.

Die erste Histon-Lysin-Methyltransferase wurde im Jahr 2000 entdeckt (Rea *et al.*, 2000). Seitdem wurden dutzende Proteine dieser Enzymklasse durch biochemische oder genetische Studien entdeckt. Im Säugergenom existieren alleine mehr als 50 Proteine mit einer katalytischen SET-Domäne (Zhang und Reinberg, 2001). Die Proteine unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität und in der Fähigkeit, Mono-, Di- oder Trimethylierung herbeizuführen (Zhang *et al.*, 2003).

Die Proteine der Suvar3-9 Familie methylieren präferenziell Lysin-9 in Histon H3 *in vitro* (Tachibana *et al.*, 2001). H3K9-Methylierung wird als ein spezifisches Merkmal

einer epigenetischen transkriptionellen Repression angesehen. Eine Reduktion der Genaktivität kann durch Induktion von lokalen dimethyl-H3K9 und trimethyl-H3K9-Markierungen in Promotorregionen erreicht werden, welche auch wieder entfernt werden können (Wysocka *et al.*, 2005). Neben G9a (Tachibana *et al.*, 2002) können mehrere euchromatische Histon-Methyltransferasen, wie beispielsweise GLP/EuHMTase1 (Ogawa *et al.*, 2002), Eset/Setdb1 (Wang *et al.*, 2003) und Riz (Kim *et al.*, 2003) diese Katalyse durchführen. Biochemische Studien mit aufgereinigtem G9a bzw. G9a mit einer Deletion der SET-Domäne zeigen, dass das Protein Mono-, Di- und Trimethylierung von N-terminal gelegenen Peptiden des Histons H3 katalysieren kann (Patnaik *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2005). Die Trimethylierung ist dabei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. H3K9-Methylierung schafft eine Bindungsstelle für das Heterochromatin Protein 1 (HP1) an Histone und ist somit an der Modulation der Chromatinstruktur beteiligt. In Säugerzellen scheint G9a die vorherrschende euchromatische H3K9-Methyltransferase zu sein, denn eine Deletion des Gens verringert den H3K9-Methylierungsstatus in euchromatischen chromosomalen Bereichen (Tachibana *et al.*, 2002). In heterochromatischen Bereichen hingegen ist die Suv39h Enzymfamilie für die Generierung und Aufrechterhaltung methylierter N-Termini von Histonen verantwortlich (Rea *et al.*, 2000). Neben der H3K9-Modifikation sind Lysin-Methyltransferasen für die Modulation der Genaktivität und Veränderungen in der Chromatin-Struktur durch andere Modifikationen verantwortlich. Die N-terminalen Regionen der Histone H3 und H4 sind im hohen Maße modifiziert. Die Lysine-4, -27 und -36 in H3 und das Lysin-20 in H4 können ebenfalls in methylierter Form vorliegen (Lachner *et al.*, 2003). H3 Lysin-79 kann ebenfalls methyliert vorliegen und ist die einzige Methylierungsstelle, die im Kernbereich der Histone liegt.

G9a besitzt neben der SET-Domäne als weiteres strukturelles Merkmal sieben Ankyrin repeats. Ankyrin repeats sind häufig vorkommende und modulare Protein-Protein-Interaktionsmotive. Als Bindungspartner von G9a wurden verschiedene DNA-bindende Proteine wie z. B. E2F6, MAG, MAX und DP1 isoliert, welche G9a in der Nähe von Histonen positionieren können (Ogawa *et al.*, 2002). Darüber hinaus ist G9a direkt mit DNMT1 assoziiert, um eine Synchronisation von DNA- und Histon-Methylierung während der S-Phase des Zellzyklus zu gewährleisten (Esteve *et al.*, 2006).

Neben der Methylierung von Lysinen in Histonen rückt die Methylierung Nicht-Histon-Proteinen in den Fokus aktueller Untersuchungen. So konnte bereits gezeigt werden, dass Trimethylierung von Lysinresten des Retinsäurerezeptors  $\alpha$  (RAR $\alpha$ ) die Interaktion mit dessen Kofaktoren, wie z. B. P/CAF, verändern kann (Huq *et al.*, 2007). Zudem wurde die Lysin-Methylierung des Tumorsuppressorproteins p53 nachgewiesen. Diese wird durch die Histon-Methyltransferase Set9 katalysiert und führt zur Veränderung der Stabilität des Proteins (Chuikov *et al.*, 2004). Set9 ist darüber hinaus in der Lage, TAF10 an einem Lysinrest zu monomethylieren. Dies erhöht die Assoziation dieses TBP-assoziierten Proteins mit der RNA-Polymerase II (Kouskouti *et al.*, 2004). Die Identifikation von Enzymen, die für die Methylierung von Lysinen in Nicht-Histonproteinen verantwortlich sind, wird damit zunehmend wichtiger.

Vor kurzem konnte das erste Enzym mit demethylierender Aktivität identifiziert werden (Shi *et al.*, 2004). LSD1 (histone-lysine-specific demethylase 1) besitzt Sequenzidentität mit einer Aminoxidase und demethyliert mono- und di-methyl-Lysin-4 in Histon H3 mit FAD als Kofaktor. Dabei wird H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Formaldehyd gebildet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass LSD1 auch die Demethylierung von mono- und dimethyliertem Lysin-9 Histon H3 herbeiführen kann (Metzger *et al.*, 2005). LSD1 ist ein Bestandteil des repressiven CtBP(C-terminal binding protein)-Komplexes (Shi *et al.*, 2003). Verblüffenderweise enthält dieser Komplex neben den Histon-Deacetylasen HDAC1 und 2 die Lysin-Methyltransferasen G9a und EuHMT. In diesem Komplex sind also sowohl Lysin-9 Histon H3 methylierende als auch demethylierende Aktivitäten miteinander verbunden. Die Suche nach weiteren demethylierenden Enzymen im Genom hat zur Identifikation der JmjC domain-



containing histone demethylase 1 (JHDM1) geführt, welche für die Demethylierung von dimethyl-Lysin-39 in Histon H3 verantwortlich ist (Tsukada *et al.*, 2006). In derselben Arbeitsgruppe konnte ein weiteres JmjC Domänen-haltiges Protein, JHDM2A, identifiziert werden, welches unter anderem dimethyl-Lysin-9 in Histon H3 demethylieren kann (Yamane *et al.*, 2006). Die Methylierung von Lysinresten ist somit reversibel und kann durch Demethylasen unterschiedlicher Proteinfamilien herbeigeführt werden.

Durch massenspektrometrische Analyse von aufgereinigtem C/EBP $\beta$  konnte Monomethylierung an Lysinen festgestellt werden (Knoblich, Vermeulen, Mann und Leutz, unpubliziert). Bislang konnten Lys-39 und Lys-168 in monomethylierter Form nachgewiesen werden. Diese Entdeckung warf direkt die Frage auf, durch welches Enzym diese posttranslationale Modifikation katalysiert wird. Die Beobachtung, dass G9a/H3-K9-HMTase 3 mit der TAD von C/EBP $\beta$  auf Protein-Microarrays (Kap. 3.2.2), in GST-Bindungsstudien und Koimmunopräzipitationsstudien interagieren kann (Kap. 3.4.1) und die Proteine im Zellkern kolokalisieren (Kap. 3.4.4), führte zur Vermutung, dass diese Methyltransferase für die Lysin-Modifikationen verantwortlich ist. Die Tatsache, dass G9a dabei trotz einer Deletion der SET-Domäne immer noch in der Lage war, die TAD von C/EBP $\beta$  zu binden, legt die Vermutung nahe, dass die Ankyrin repeats diese Bindung vermitteln. Zudem konnte die Interaktionsdomäne in C/EBP $\beta$  auf CR4 eingegrenzt werden (Abb. 3.11).

Lysin-methyliertes C/EBP $\beta$  konnte mit einem anti-pan-methyl-Lysin Antikörper nachgewiesen werden (dieser erkennt mono-, di- und trimethylierte Lysine) und der Anteil an methyliertem C/EBP $\beta$ -Protein konnte in Zellen durch Kotransfektion von G9a erhöht werden (Abb. 3.12). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass rekombinantes C/EBP $\beta$  Protein (sowohl GST-CR1-7 als auch GST-LIP) ein Substrat für die *in vitro*-Methylierung durch G9a ist (Abb. 3.13 und 3.14). In Reporterstudien konnte gezeigt werden, dass eine Koexpression von G9a die transkriptionelle Aktivität von C/EBP $\beta$  herunterreguliert (Kap. 3.4.3). Eine inaktive Form von G9a mit einer Deletion der katalytischen SET-Domäne konnte diese Verminderung der transkriptionellen Aktivität nicht bewirken. Die Mutation von Lys-39 und Lys-168 in Alanin führten zu einer Steigerung der Aktivität des Proteins und zu einem Verlust der Reprimierbarkeit durch G9a (Abb. 3.15). Lysin-Methylierung von C/EBP $\beta$  durch G9a führt also zur Repression des Transkriptionsfaktors bzw. zu dessen Inaktivierung. Zwischen Inaktivierung des Proteins durch Methylierung und der Repression durch einen Kofaktor kann hierbei aufgrund fehlender Testsysteme nicht unterschieden werden.

Bislang konnte durch massenspektrometrische Analysen nur eine Monomethylierung von Lysinen in C/EBP $\beta$  gezeigt werden. Ob auch di- oder trimethylierte Formen von C/EBP $\beta$  existieren, und welche Enzyme diese Schritte katalysieren, ist bislang noch nicht bekannt. Besonders interessant ist die Beobachtung, dass Lys-39 auch in acetylierter Form vorliegen kann (Cesena *et al.*, 2007). Acetylierung und Methylierung konnte durch Arbeiten in unserer Gruppe auch an Lys-168 durch massenspektrometrische Untersuchungen nachgewiesen werden. Die Acetylierung führt hier ebenfalls zu einer Änderung der Aktivität des Transkriptionsfaktors. Methylierung und Acetylierung an dieser Position könnten sich wechselseitig ausschließen und spezifische Effekte nach sich ziehen. Die Signalwege, die zur Methylierung von C/EBP $\beta$  führen, sind nicht verstanden.

Die Position in C/EBP $\beta$ , an der die Lysin-Methylierung durch G9a katalysiert wird, konnte bislang noch nicht identifiziert werden. In Histon H3 ist die minimale Sequenz, welche noch durch G9a methyliert werden kann, als das Heptapeptid TARKSTG bestimmt worden (Chin *et al.*, 2005). Im C-terminalen Bereich von C/EBP $\beta$  ist ein RKS-haltiges Motiv vorhanden (Lys-270), welches eine Akzeptorsequenz für die Methylierung durch G9a enthalten könnte. Durch *in vitro* Methylierung konnte jedoch kein Unterschied in der Markierbarkeit des Substrates (GST-LIP im Vergleich zu GST-LIP

K270A) festgestellt werden. Die Lys-39 und Lys-168 werden z. Z. auf Methylierbarkeit durch G9a getestet.

#### **MRG-binding protein:**

Histon-Acetyltransferasen sind Schlüsselenzyme für die Regulation von Genexpression. Das MRG-binding protein ist eine Komponente des NuA4 Histon-Acetyltransferase Komplexes, welcher die Aktivierung bestimmter Gene durch Acetylierung der Histonproteine H4 und H2A bewirkt und somit einen Einfluß auf verschiedene zelluläre Funktionen hat (Doyon und Cote, 2004). Diese posttranslationale Modifikation neutralisiert positive Ladungen an Lysin-Gruppen und verändert damit die Interaktionen zwischen Nukleosomen und DNA, zwischen Nukleosomen und assoziierten Proteinen und zwischen verschiedenen Nukleosomen. Acetylierung beeinflusst deshalb die Ausbildung von Chromatinstrukturen aber auch die Interaktion von spezifischen Proteinen mit Chromatin. Durch die Veränderung der Interaktionsfläche können Proteine gebunden werden, welche die Transkription verstärken. Der NuA4-Komplex könnte für die Aktivierung von transkriptionellen Programmen verantwortlich sein, welche mit Onkogen bzw. Proto-Onkogen vermittelter Wachstumsinduktion, Tumor-Suppressor vermittelter Wachstumsarrest und replikativer Seneszenz, Apoptose und DNA Reparatur verbunden sind. Der NuA4 Histon Acetyltransferase-Komplex enthält als katalytische Untereinheit Tip60.

Die Acetylierung von C/EBP $\beta$  an unterschiedlichen Lysinresten durch p300/CBP wurde kürzlich beschrieben (Cesena *et al.*, 2007). Es besteht daher auch die Möglichkeit, dass eine Acetylierung von C/EBP $\beta$  neben p300/CBP auch durch den NuA4 Histon-Acetyltransferase Komplex katalysiert werden kann.

#### **Pim-3:**

Bei der Serin/Threonin-Proteinkinase Pim-3 handelt es sich um ein Proto-Onkogen, welches eine wichtige Rolle bei der Zellzykluskontrolle und bei anti-apoptotischen Prozessen spielt. Sie scheint eine wichtige Rolle bei der Proliferation von humanen Hepatom-Zelllinien zu spielen (Fujii *et al.*, 2005). Pim-3 könnte die Phosphorylierung von C/EBP $\beta$  katalysieren.

### **4.3.3 Moleküle in Signaltransduktionskaskaden**

Eine relativ kleine Anzahl von konservierten Signalwegen wird in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Organismen benutzt, um verschiedene biologische Prozesse zu steuern. Diese Signalwege treffen sich an Kreuzungspunkten und können so die gleichen Zellen oder die gleichen Prozesse beeinflussen. Eine wichtige Frage ist, wie unterschiedliche Signale integriert werden. Dies geschieht oft auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren. C/EBP $\beta$  ist das Ziel von Signaltransduktionskaskaden. Das Protein wird über die MAPK-Enzymkaskade phosphoryliert und dabei in seiner Aktivität verändert (Nakajima *et al.*, 1993; Trautwein *et al.*, 1993; Kowenz-Leutz *et al.*, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurden Moleküle aus anderen Signaltransduktionskaskaden identifiziert, die mit C/EBP $\beta$  interagieren. Dies lässt die Vermutung zu, dass C/EBP $\beta$  durch weitere Signalwege in seiner Aktivität moduliert wird.

Nr.	Beschreibung nach UniGene Datenbank	Familie	Funktion
14	Axin 1	Signaltransduktion	Wnt-Signaltransduktion
79	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila) (NOTCH1)	Signaltransduktion	Notch-Signaltransduktion
80	Notch homolog 3 (Drosophila) (NOTCH3)	Signaltransduktion	Notch-Signaltransduktion

**Tab. 4.3: Interaktionspartner der C/EBP $\beta$  TAD - Moleküle in Signaltransduktionskaskaden.** Die Tabelle zeigt drei Interaktionspartner, die den Signaltransduktoren zugeordnet werden können.

#### Axin-1:

Axin-1 ist ein Inhibitor des Wnt-Signalweges. Das Molekül  $\beta$ -Catenin wird durch Axin-1 in seiner Aktivität gehemmt. Vermutlich wird durch Axin-1 die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und APC durch GSK3 $\beta$  erleichtert. Wahrscheinlich wirkt es daher als Tumor-Suppressor-Molekül. Die Interaktion zwischen Axin-1 und  $\beta$ -Catenin wird durch die Armadillo-Repeats in  $\beta$ -Catenin vermittelt. Zusätzlich kann Axin-1 mit Plakoglobin ( $\gamma$ -Catenin), APC, Dvl und PP2A interagieren.

#### Notch1 und Notch3:

Der Notch-Signalweg wurde bereits an anderer Stelle beschrieben (siehe Kap. 3.2.3). Im Folgenden werden die physiologischen Funktionen von Notch skizziert.

Mäuse, in denen Notch1 konstitutiv ausgeschaltet ist, zeigen vielfältige Defekte. Neben abnormaler Genese der Somiten kommt es zu einer gestörten Entwicklung der Blutgefäße und die Tiere sind embryonal lethal vor E11.5 (Swiatek *et al.*, 1994; Conlon *et al.*, 1995). Notch-Signalwege beeinflussen die Implementierung des embryonalen hämatopoietischen Systems. Durch den Rezeptor entwickeln sich hämatopoietische Stammzellen („hematopoietic stem cells“, HSC) aus Hämangioblasten. Notch-Rezeptoren sind auch später in vielen hämatopoietischen Zellen exprimiert. Eine konditionale Inaktivierung der Notch-Allele verhindert das frühe Absterben der Tiere und erlaubt die Charakterisierung von Notch-Effekten in verschiedenen Organsystemen (Radtke *et al.*, 1999). Dabei wurde die Rolle von Notch bei der T-/B-Zell-Entscheidung in der lymphatischen Entwicklung deutlich; andere Aspekte der Hämatopoiese blieben von Notch unbeeinflusst. Ähnliche Ergebnisse wurden nach einer konditionalen Inaktivierung von CSL gewonnen (Han *et al.*, 2002). Im Thymus sind Notch-Signale notwendig für die Differenzierung von verschiedenen Vorläuferzellen in T-Zellen, ein Fehlen des Rezeptors führt zur verstärkten Reifung von B-Zellen (Radtke *et al.*, 2004). In der DN1-Entwicklungsstufe von Thymus-Vorläuferzellen sind die myeloiden Transkriptionsfaktoren C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  und PU.1 exprimiert und funktionell. Im Verlauf der T-Zell-Reifung kommt es durch Notch-Signale zu einer verminderten Expression dieser Transkriptionsfaktoren. Retrovirale Transduktion von C/EBPs oder PU.1 in DN1 Thymozyten führt zudem zu einer Konversion dieser Vorläuferzellen in Makrophagen und Dendritischen Zellen und verhindert die T-Zell-Differenzierung (Laiosa *et al.*, 2006).

Neueren Erkenntnissen zufolge ist Notch1 entscheidend für die Genese von hämatopoietischen Stammzellen, wird jedoch nicht gebraucht, wenn der Pool an Stammzellen schon angelegt wurde. Dies ist auch für andere Gene bekannt, die eine Rolle bei der frühen hämatopoietischen Entwicklung und der Gefäßentwicklung spielen. Eine Deletion des SCL/tal-1 Gens führt beispielsweise zum Verlust von primitiver und definitiver Hämatopoiese und führt zu Defekten in der Angiogenese (Orkin und Zon, 2002). Eine konditionale Inaktivierung führt auch hier zu keiner Veränderung der HSC-Funktion zu späteren Entwicklungszeitpunkten (Mikkola *et al.*, 2003).

Mitglieder der Notch-Familie, vor allem Notch1 und Notch3, spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Lymphozyten. Eine konstitutive Aktivierung von Notch in hämatopoietischen Knochenmarkzellen oder T-Vorläuferzellen blockiert de-

ren Differenzierung (Pear und Aster, 2004). Aktivierende Mutationen im humanen *Notch1*-Gen führen zur Entstehung von akuter lymphatischer Leukämie der T-Zellen (T-ALL, Lymphoblastenleukämie) (Ellisen *et al.*, 1991; Weng *et al.*, 2004) und aktivierte Notch-Moleküle verstärken T-Zell-Tumore in der Maus (Pear *et al.*, 1996; Belavia *et al.*, 2000). Notch kann jedoch nicht nur als Onkogen, sondern auch als Tumorsuppressor wirken. In der Epidermis verhindert Notch1 die Zellproliferation und fördert die Differenzierung von Keratinozyten, während konditionelle Notch1-„knock-out“ Mäuse Basalzellkarzinome entwickeln (Rangarajan *et al.*, 2001; Nicolas *et al.*, 2003; Okuyama *et al.*, 2004). Wie bei der Entwicklung von *C. elegans* und *D. melanogaster* scheinen die spezifischen Folgen von Notch-Signalen auch bei der Krebsentstehung stark abhängig vom jeweiligen Kontext zu sein.

In welchem Maße die unterschiedlichen Notch-Moleküle redundante Aufgaben übernehmen oder spezifische Funktionen in der Zelle ausüben ist nicht genau verstanden. Die Beobachtung, dass Notch1 bzw. Notch3 als Bindungspartner von C/EBP $\beta$  identifiziert wurden (siehe Tab. 3.1 (Anhang)), könnte darauf hindeuten, dass C/EBP $\beta$  das Ziel unterschiedlicher Notch-Signalwege ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Domäne von Notch1 IC auf Protein-Microarrays (Kap. 3.2.2), in GST-Bindungsstudien und Koimmunopräzipitationsexperimenten mit der TAD von C/EBP $\beta$  interagieren kann (Abb. 3.18). Die Anwesenheit der RAM-Domäne in Notch1 IC ist keine Voraussetzung für die Assoziation der Moleküle. In C/EBP $\beta$  ist die konservierte Region 4 (CR4) die Hauptinteraktionsdomäne. Auch hier scheint die Bindung über die Ankyrin repeats vermittelt zu werden, analog zur Interaktion von C/EBP $\beta$  mit G9a (siehe auch Kap. 4.3.2). In Jurkat-Zellen, welche über erhöhte Mengen von Notch1 IC verfügen, konnte eine Assoziation zwischen C/EBP $\beta$  und Notch1 IC auf endogenem Proteinexpressionsniveau bestätigt werden (Kap. 3.5.2). Notch1 IC beziehungsweise Notch1 IC  $\Delta$ RAM sind in der Lage, die C/EBP $\beta$ -abhängige Transkription zu verstärken (Kap. 3.5.4). Dies konnte sowohl in C/EBP $\beta$ -abhängigen Reporterstudien als auch in Reporterstudien mit C/EBP $\beta$ -gal4 DBD Fusionskonstrukten gezeigt werden. Eine Verstärkung der C/EBP $\beta$ -abhängigen Transkription durch Koexpression von Notch1 IC wurde bereits für das PSG-Gen *rnCGM3* (PSG: Pregnancy-specific glycoprotein) gezeigt (Chen *et al.*, 2000). Ferner war Notch1 IC in der Lage, im Chromatin eingebettete reprimierte myeloide Gene zusammen mit C/EBP $\beta$  und c-Myb zu aktivieren (Abb. 3.23). Zusammengefasst legen diese Daten die Vermutung nahe, dass C/EBP $\beta$  ein Effektormolekül des Notch-Signalweges ist.

C/EBP $\alpha$  und  $\beta$  spielen ebenso wie Notch-Transmembranrezeptoren eine wichtige Rolle bei der adipozytären Differenzierung. C/EBP $\beta$  wird früh während der Adipogenese induziert und führt zur Induktion von C/EBP $\alpha$  und peroxisome proliferator-activating receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) während der späten Phase der Differenzierung. Diese Transkriptionsfaktoren sind direkt für die Aktivierung einer Reihe von Adipozytenspezifischen Genen verantwortlich.

Notch-Signale sind eine notwendige Voraussetzung für die Bildung von Fettzellen aus 3T3-L1 Präadipozyten (Garces *et al.*, 1997). Andere Studien hingegen haben gezeigt, dass Notch-Signale die Differenzierung von 3T3-L1 Präadipozyten blockieren (Ross *et al.*, 2004) und dass eine konstitutive Expression von Hes-1, einem Zielmolekül des Notch-Signalweges, zum gleichen Effekt führt (Ross *et al.*, 2006).

Die Beobachtung, dass C/EBP $\beta$  der Aktivierbarkeit der RBP-J $\kappa$ /CSL-abhängigen Transkription durch Notch entgegenwirkt (Kap. 3.5.5), könnte auf einen wichtigen Schritt bei der Induktion der Adipogenese hindeuten. Eine direkte Interaktion zwischen Notch1 IC und C/EBP $\beta$  könnte deshalb von entscheidender Bedeutung während der frühen Phase der Adipogenese sein.

#### 4.3.4 Transkriptionsfaktoren und Koregulatoren

Im folgenden Abschnitt sind Transkriptionsfaktoren und transkriptionelle Koregulatoren zusammengefasst.

Nr.	Beschreibung nach UniGene Datenbank	Familie	Funktion
16	Caudal type homeo box transcription factor 1 (CDX1)	Transkription	Homöobox-Transkriptionsfaktor
61	Homeobox protein Hox-A11	Transkription	Homöobox-Transkriptionsfaktor
81	Nuclear factor of activated T-cells, calcineurin-dependent 3 (NFATC3)	Transkription	Cytokin-induzierbarer Transkriptionsfaktor
82	Nuclear receptor co-repressor (NCOR)	Transkription	Transkriptioneller Repressor
83	Nuclear receptor co-repressor 2 (NCOR2)	Transkription	Transkriptioneller Repressor
98	Promyelocytic leukemia (PML)	Transkription	Transkriptionsfaktor
114	TIF1beta zinc finger protein	Transkription	Transkriptioneller Repressor/Aktivator

**Tab. 4.4: Interaktionspartner der C/EBP $\beta$  TAD - Transkriptionsfaktoren und Koregulatoren.** Die Tabelle zeigt sieben Interaktionspartner, die den Transkriptionsfaktoren oder transkriptionellen Aktivatoren/Repressoren zugeordnet werden können.

##### CDX1:

CDX1 gehört zur Familie der „Caudal-type homeobox proteins“ mit einer DNA-bindenden Homöobox-Domäne. Das Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Darms und kontrolliert die Proliferation und Differentiation von intestinalen Mucosazellen (Guo *et al.*, 2004). Eine fehlerhafte Expression der Gene dieser Familie korreliert mit der Karzinogenese des gastrointestinalen Traktes. Eine funktionelle Abhängigkeit zwischen CDX und C/EBP-Proteinen wurde bereits beschrieben (Staloch *et al.*, 2005). Diese Interaktionen könnten zur differentiellen transkriptionellen Regulation in verschiedenen Kompartimenten des Darms dienen.

##### Hox-A11:

Das Homöobox-Protein Hox-A11 ist ein Sequenz-spezifischer Transkriptionsfaktor und Teil eines regulatorischen Systems, welches Zellen ihre relative Position entlang der anterior-posterior-Achse von Organismen vermittelt. Es gehört zur Abd-B Homöobox-Familie und verfügt über eine Homöobox DNA-bindende Domäne. Interessanterweise ist Hox-A11 in allen Entwicklungsstadien von Thymozyten exprimiert (Taghon *et al.*, 2003). Es kann demnach auf eine Rolle von Hox-A11 in Verbindung mit C/EBP $\beta$  bei der Hämatopoiese geschlossen werden.

##### NFATc3:

Der Transkriptionsfaktor NFATc3 spielt eine Rolle bei der induzierbaren Expression von Cytokin-Genen in T-Zellen, insbesondere bei der Induktion von IL-2. NFATc3 ist eine Komponente des NFATc Transkriptionskomplexes, welcher mindestens aus zwei Komponenten besteht: Einer cytoplasmatischen Komponente NFATc2 und einer induzierbaren nukleären Komponente NFATc1. Weitere Komplexpartner wie NFATc3 oder c4, Mitglieder der AP-1 Familie, GATA4 und Cbp/p300 können ebenfalls Bestandteile des Komplexes sein. NFATc Proteine binden DNA als Monomere. NFATc3 liegt im Cytoplasma hauptsächlich in der phosphorylierten Form vor und wird konstitutiv durch die NFATc-Kinase phosphoryliert. Kommt es zur Calcineurin-abhängigen Dephosphorylierung, liegt NFATc3 hauptsächlich im Nukleus vor. Bei einem Sinken der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration kommt es zu einem schnellen Kernexport des Proteins und einer Rückkehr in den Ruhezustand. Die subzelluläre Lokalisation spielt damit eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genaktivierung durch NFATc-Proteine.

**N-CoR und N-CoR2:**

N-CoR und das eng verwandte Protein N-CoR2 (SMRT) sind transkriptionelle Repressormoleküle. Beide Proteine gehören zur Familie der Kernrezeptor Korepressoren. Beim Fehlen eines an Thyroidhormon- oder Retinsäurerezeptoren gebundenen Liganden ist der ca. 1,5-2 MDa große Repressorkomplex mit den entsprechenden Rezeptoren assoziiert. N-CoR Proteine sind mit Histon-Deacetylasen wie z. B. SIN3A/B, HDAC1 und HDAC2 assoziiert, welche zur Bildung von kondensiertem Chromatin führen können. Dadurch wird der Zugang der basalen Transkriptionsmaschinerie zur DNA-Matrize erschwert und die Genexpression vermindert.

Die N-CoR2/SMRT-Form interagiert mit der Histon-Deacetylase HDAC10 (Fischer *et al.*, 2002). HDAC10 wurde im Rahmen dieser Arbeit als ein Interaktionspartner von C/EBP $\beta$  identifiziert (siehe Tab. 3.1, Eintrag Nr. 58). Eine direkte Assoziation zwischen C/EBP $\beta$  und N-CoR2 wurde bereits beschrieben (Ki *et al.*, 2005). Die Interaktion wird durch die transaktivierende Region von C/EBP $\beta$  vermittelt. Es besteht demnach die Möglichkeit, dass C/EBP $\beta$  mit seiner transaktivierenden Region einen Korepressorkomplex rekrutieren kann, welcher zum einen aus N-CoR/N-CoR2 und zum anderen aus HDAC10 besteht. Die Verifizierung der Bindung von N-CoR2 an C/EBP $\beta$  auf dem Protein-Microarray zeigt, dass die beschriebene Technologie zur Identifikation unbekannter Interaktionspartner verwendet werden kann.

**PML:**

PML ist vermutlich ein Transkriptionsfaktor. PML dient als Markerprotein für „nuclear bodies“. Das Protein könnte eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Faktoren zu Kernkörpern spielen. Eine chromosomale Translokation t(15;17)(q21;q21) fusioniert das PML Protein mit dem Retinsäurerezeptor  $\alpha$ . Diese Aberration kann der Auslöser für Akute Promyelocytische Leukämie (APL) sein.

**Tif1 $\beta$ :**

Tif1 $\beta$  kann als transkriptioneller Repressor oder Aktivator wirken. Das Protein ist mit KRAB-Domänen haltigen Transkriptionsfaktoren assoziiert und erhöht die Effizienz KRAB-vermittelter Repression. Transkriptionelle Repression wird vermutlich durch eine Interaktion zwischen Tif1 $\beta$  und verschiedenen Formen von HP1 vermittelt. Eine direkte Assoziation zwischen C/EBP $\beta$  und Tif1 $\beta$  wurde bereits in verschiedenen Publikationen gezeigt (Chang *et al.*, 1998; Rooney und Calame, 2001). Da ein Teil der Daten von Rooney *et al.* gefälscht wurden, ist die Datenlage zur funktionellen Verbindung von C/EBP $\beta$  und Tif1 $\beta$  jedoch unklar. Als gesichert kann gelten, dass Tif1 $\beta$  als Aktivator für die C/EBP $\beta$ -abhängige Transkription wirken kann. Weder in GST-Bindungsexperimenten mit *in vitro* translatiertem Tif1 $\beta$  noch in Koimmunopräzipitationsstudien konnte in dieser Arbeit eine direkte Assoziation zwischen Tif1 $\beta$  und C/EBP $\beta$  festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), obwohl eine Interaktion auf dem Protein-Microarray detektiert werden konnte (siehe Tab. 3.2, Eintrag Nr. 114).

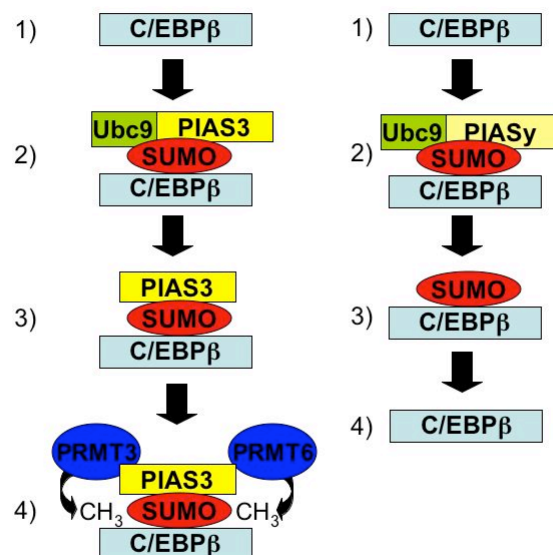
#### **4.4 Interaktion und Repression von SUMO-modifiziertem C/EBP $\beta$ durch PIAS3**

Alle Mitglieder der PIAS-Familie können mit SUMO-1 und Ubc9 interagieren und die SUMOylierung von Substratproteinen verstärken. Sie wirken folglich analog zur Ubiquitinierung als E3-Ligase bei der SUMO-Katalyse (Kotaja *et al.*, 2002). Beide Eigenschaften sind abhängig von der zentral gelegenen SP-RING Domäne, welche zwischen PIAS1, PIAS3, PIASx und PIASy konserviert ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Fähigkeit der verschiedenen PIAS-Proteine untersucht, als E3-

Ligase für die Konjugation von SUMO-1 an C/EBP $\beta$  zu wirken. Dabei zeigte sich, dass PIAS1 und PIAS3 die SUMOylierung von C/EBP $\beta$  verstärken konnten, PIASy hingegen nur in geringerem Maße dazu in der Lage war (Kap. 3.6.2). PIAS1 und 3 können also als wirksamere E3-Ligasen im Vergleich zu PIASy betrachtet werden. In Interaktionsstudien wurde darüber hinaus deutlich, dass nur SUMO-modifiziertes C/EBP $\beta$  in der Lage war, PIAS3 zu binden und dass diese Bindung bei unmodifiziertem Protein nicht ausgebildet werden kann (Kap. 3.6.3). PIASy hingegen konnte nicht mit C/EBP $\beta$ , weder in seiner modifizierten noch in seiner unmodifizierten Form, interagieren (Kap. 3.6.5). Entscheidend für die Interaktion zwischen C/EBP $\beta$  und PIAS3 war eine intakte Struktur des SP-RINGs. Durch Einfügen einer substituierenden Aminosäure wurde die räumliche Struktur des SP-RINGs zerstört und die Interaktion mit SUMOyliertem C/EBP $\beta$  ging verloren (Abb. 3.27). In Reporterstudien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die SUMOylierung von C/EBP $\beta$  eine notwendige Voraussetzung für die Repression durch PIAS3 ist und dass der repressive Effekt von PIASy unabhängig von der SUMOylierbarkeit des Proteins ist (Abb. 3.6.6). Schließlich wurde deutlich, dass PIAS1, PIAS3 und PIASx in der Lage sind, die Arginin-Methyltransferasen PRMT 3 und 6 zu rekrutieren, während PIASy dazu nicht in der Lage war (Kap. 3.6.7). Da PRMTs in der Lage sind, C/EBP $\beta$  an Argininresten zu methylieren und dadurch das Protein zu reprimieren (Kowenz-Leutz und Leutz, unpubliziert), könnte dies den repressiven Effekt von PIAS3 erklären.

PIAS Proteine unterschieden sich vor allem in ihren C-terminalen Bereichen. PIASy ist im Gegensatz zu PIAS1, PIAS3 und PIASx C-terminal verkürzt. Daraus erklären sich spezifische Funktionen von PIASy, wie beispielsweise die Fähigkeit, bei Überexpression zelluläre Seneszenz zu induzieren (Bischof *et al.*, 2006). Dies könnte auch die starke Repression von C/EBP $\beta$ -abhängiger Transkription durch PIASy erklären, die unabhängig von der SUMOylierbarkeit des Transkriptionsfaktors zu beobachten ist.

Abb. 4.1 fasst die repressive Wirkung von PIAS3 im Vergleich zu PIASy in einem Modell zusammen.



**Abb. 4.1: Modell für die Repression durch PIAS3.** 1) C/EBP $\beta$  liegt in nichtmodifizierter Form vor. 2) Ubc9/PIAS/SUMO-1-Komplexe erkennen das SUMOylierungsmotiv in C/EBP $\beta$  und die SUMOylierung findet statt. 3) PIAS3 bleibt an SUMOyliertem C/EBP $\beta$  gebunden, PI-

ASy bindet nicht. 4) PRMT3 und PRMT6 können C/EBP $\beta$  methylieren und so zur Repression des Transkriptionsfaktors führen.

PIAS-Proteine können einen positiven oder negativen Einfluss auf die Genregulation haben. Für die negative Regulation von Transkriptionsfaktoren durch PIAS wurden bislang vier unterschiedliche Mechanismen vorgeschlagen (Shuai und Liu, 2005).

Zum einen kann PIAS die DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren stören. PIAS1 kann beispielsweise die DNA-bindenden Eigenschaften von STAT1 oder NF- $\kappa$ B p65 inhibieren (Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2005). Eine andere Möglichkeit der negativen Regulation ist die Rekrutierung von transkriptionellen Korepressormolekülen wie z. B. Histon-Deacetylasen (HDACs) durch PIAS. HDACs sind Enzyme, die die Abspaltung von Acetyl-Gruppen von Lysinresten in Histon- und nicht-Histon-Proteinen bewirken. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription durch die Modifikation von Chromatin. PIASx $\beta$  kann beispielsweise mit HDAC3 interagieren (Tussie-Luna *et al.*, 2002). Weitere Daten, die auf eine PIAS-abhängige Repression durch HDACs hinweisen, stammen von Experimenten mit dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA). Die Repression der STAT4-abhängigen Genaktivierung durch PIASx kann beispielsweise durch TSA aufgehoben werden (Arora *et al.*, 2003). Auch der repressive Effekt von PIASy auf SMAD3 (Long *et al.*, 2003) oder den Androgen-Rezeptor (Gross *et al.*, 2004) kann durch TSA abgeschafft werden.

Als dritte Möglichkeit können PIAS-Proteine die Aktivität von Transkriptionsfaktoren negativ beeinflussen, indem sie als SUMO-E3-Ligasen wirken und die SUMOylierung von Transkriptionsfaktoren verstärken. Die Einflüsse der SUMOylierung auf Proteine sind bereits beschrieben worden (siehe Kap. 1.3) und können vielfältig sein.

PIAS-Proteine können darüber hinaus Transkriptionsfaktoren reprimieren, indem diese in spezifische subnukleäre Strukturen transportiert werden. Eine Koexpression von PIASy und Lef1 beispielsweise führt zur Lokalisation des Komplexes in „nuclear bodies“ (Sachdev *et al.*, 2001). Andere Publikationen hingegen verweisen auf die gleichförmige Verteilung von PIAS1 und PIASy im Kern (Liu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005).

Beispiele für eine positive Regulation durch PIAS-Proteine sind weit seltener. Die Repression des Androgen-Rezeptors durch PIASy wurde bereits oben erwähnt. Die anderen Proteine der PIAS-Familie (PIAS1, PIAS3 und PIASx) scheinen die Aktivität des Androgen-Rezeptors unter den gleichen Bedingungen jedoch zu verstärken. (Gross *et al.*, 2001). Auch bei der Regulation von SMAD3 wurde eine Repression durch PIASy, jedoch eine Aktivierung durch PIAS3 vorgeschlagen (Long *et al.*, 2004). Diese Aktivierung wird vor allem durch Rekrutierung von p300/CBP erreicht.

## 4.5 Neue Interaktionspartner der C/EBP $\beta$ regulatorischen Domäne

### 4.5.1 Bindungspartner der RD in ihrer nicht-SUMOylierten Form

Nachfolgend sind in Tab. 4.5 die Proteine aufgeführt, die nur mit der nicht-SUMOylierten Proteinsonde eine Interaktion zeigten.

Nr.	Beschreibung nach UniGene Datenbank	Funktion
	<b>Interaktion mit CR567</b>	
19	cDNA FLJ23797 fis, clone HEP22157, highly similar to nuclear zinc finger protein Np95 (UHRF1)	E3 Ubiquitin-Protein Ligase
34	Methyl-CpG binding domain protein 1 (MBD1), transcript variant 1	Bestandteil des MeCP1-Komplexes
35	Methyl-CpG binding domain protein 6 (MBD6)	Unbekannt
38	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2 (MLL2)	Trithorax-Protein
53	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (MYC)	bHLH Transkriptionsfaktor

**Tab. 4.5: Interaktionspartner der C/EBP $\beta$  RD in ihrer nicht-SUMOylierten Form.**



**UHRF1:**

Bei UHRF1 handelt es sich um eine E3-Ligase, welche den dritten Schritt der Ubiquitin-Konjugation katalysiert. Das Molekül scheint auf unterschiedlichen Ebenen an der transkriptionellen Regulation beteiligt zu sein. Zum einen bindet es die Histon-Moleküle H3, H1 und H2B direkt. Zum anderen scheint es direkt an methylierte CpG-haltige Oligonukleotide binden zu können. Die Bindung erfolgt an invertierte 5'-CCAAT-3' Sequenzmotive und kann als transkriptioneller Aktivator wirken. Darüber hinaus bindet UHRF1 transkriptionelle Kofaktoren wie beispielsweise HDAC1. Funktionell scheint das Molekül eine wichtige Aufgabe bei der Zellzyklusregulation beim Übergang zwischen G1- und S-Phase zu spielen. Darüber hinaus wurde eine Funktion bei DNA Reparatur und chromosomaler Stabilität postuliert.

**MBD1:**

MBD1 ist ein Bestandteil des MeCP1-Komplexes und gilt als transkriptioneller Repressor. Die N-terminal gelegene methyl-CpG-binding Domäne (MBD) ist in der Lage methylierte CpG-Oligonukleotide zu binden und dient darüber hinaus als Protein-Interaktionsdomäne. Über sie kann beispielsweise ein Suv39h1-CBX5 Komplex gebunden werden. MBD1 kann darüber hinaus die Histon-Methyltransferase Setdb1 binden und so Zielgene durch Methylierung von Lysin-9 in Histon 3 transkriptionell stilllegen. Eine PIAS3-abhängige Modifikation von MBD1 mit SUMO führt dazu, dass das Protein nicht mehr in Setdb1-haltige Komplexe integriert werden kann und somit die repressiven Eigenschaften verloren gehen (Lyst *et al.*, 2006). Dadurch verliert das Protein seine repressiven Eigenschaften. Einer neueren Studie zufolge kann MBD1 mit Ring1b und hPc2 interagieren, den Hauptkomponenten des Polycomb repressive complex 1 (PRC1) (Sakamoto *et al.*, 2007). Die Komponenten des PRC1-Komplexes, welche C/EBP $\beta$  binden können, sind bereits im Kapitel 4.3.1 diskutiert worden. C/EBP $\beta$  scheint demnach in der Lage zu sein, unterschiedliche repressive Komplexe über die transaktivierende und regulatorische Domäne zu binden und so die epigenetische Stilllegung bestimmter Bereiche im Chromatin zu bewirken.

Die Tatsache, dass unmodifiziertes C/EBP $\beta$  in der Lage ist, MBD1 zu binden, jedoch die SUMO-modifizierte Form dazu nicht mehr in der Lage ist, lässt auf eine regulative Rolle der SUMOylierung bei der Rekrutierung des Komplexes schließen. Über die Rolle von MBD6 ist wenig bekannt. Das Protein verfügt jedoch auch über eine methyl-CpG-binding Domäne (MBD) und gehört damit in dieselbe Proteinfamilie wie MBD1.

**MLL2:**

MLL2 gehört zur Familie der Trithorax-Proteine. Diese wirken der epigenetischen Aktivität von Polycomb-Proteinen entgegen und führen zu einer Aktivierung von entwicklungsbiologisch relevanten Genen. MLL2 enthält eine SET-Domäne und verfügt über Methyltransferase-Aktivität für Histon 3 Lysin-4. Das Protein ist ein Bestandteil des ASC-2/NCOA6 Komplexes (ASCOM), welcher ASC-2/NCOA6, das Rb-bindende Protein RBQ-3/RBBP5, alpha- und beta-Tubulin, die Trithorax-Proteine MLL2 und MLL3 und ASH2/ASCL2 enthält (Goo *et al.*, 2003). Chromosomale Translokationen unterschiedlichster Art zwischen *ml/2* und anderen Genen werden mit einem Block der hämatopoietischen Differenzierung und aggressiven akuten Leukämien assoziiert (Hess, 2004). Die normale Funktion von MLL2 und Methylierung von Histon H3 Lysin-4 scheinen deshalb wichtig für die Homöostasis der Blutzellproliferation und -differenzierung zu sein. Auf die Lysin-Methylierung von C/EBP $\beta$  wurde an anderer Stelle bereits eingegangen (siehe Kap. 3.4.2). MLL2 könnte also auch für die Lysin-Methylierung von C/EBP $\beta$  verantwortlich sein.

**c-Myc:**

c-Myc ist ein „basic helix-loop-helix“ Transkriptionsfaktor, welcher für die Expression von Wachstums-Genen eine wichtige Rolle spielt. Es bindet DNA als Heterodimer mit Max. Überexpression von Myc spielt eine Rolle bei einer Vielzahl hämatopoietischer Tumore.

#### 4.5.2 Bindungspartner der RD in ihrer SUMOylierten und nicht-SUMOylierten Form

Nachfolgend ist in Tab. 4.6 der Interaktionspartner aufgeführt, der unabhängig von SUMOylierungsstatus der C/EBP $\beta$ -Sonde an der gleichen Position auf beiden Protein-Macroarrays gefunden wurde.

Nr.	Beschreibung nach UniGene Datenbank	Funktion
	Interaktion mit CR567 oder CR567-SUMO1	
18	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A), transcript variant 2	Zellzyklus-Regulator

**Tab. 4.6: Interaktionspartner der C/EBP $\beta$  RD in ihrer nicht-SUMOylierten oder SUMOylierten Form.**

**p21:**

Das inhibitorische Molekül p21 ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus. Es bindet an „cyclin-dependent kinases“ (CDKs) und inhibiert dadurch deren Aktivität. Somit wird die Phosphorylierung wichtiger CDK-Substrate verhindert und eine Blockierung der Progression durch den Zellzyklus bewirkt. Die Tatsache, dass sowohl SUMOyliertes als auch nicht-SUMOyliertes C/EBP $\beta$  p21 binden kann deutet auf eine Unabhängigkeit der Bindung von SUMOylierung hin.

#### 4.5.3 Bindungspartner der RD in ihrer SUMOylierten Form

Nachfolgend sind die Proteine aufgeführt, die nur mit der SUMOylierten Proteinsonde eine Interaktion zeigten.

Nr.	Beschreibung nach UniGene Datenbank	Funktion
	Interaktion mit CR567-SUMO1	
6	Breakpoint cluster region (BCR), transcript variant 1	GTPase aktivierendes Protein
8	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2 (CITED2)	Transkriptioneller Co-Regulator
32	SRY (sex determining region Y)-box 4 (SOX4)	HMG-Box Transkriptionsfaktor

**Tab. 4.7: Interaktionspartner der C/EBP $\beta$  RD in ihrer SUMOylierten Form.**

**BCR:**

BCR ist ein GTPase-aktivierendes Protein. Es bewirkt den Austausch von RAC- bzw. CDC42-gebundenem GDP durch GTP und führt so zu einer Aktivierung der Proteine. Das Protein besitzt Serin-/Threonin-Kinase Aktivität. Eine chromosomale Aberration von BCR ist eine Ursache für chronische myeloide Leukämie (CML). Die t(9;22)(q34;q11) Translokation mit ABL1 führt zur BCR-ABL Fusionen, welche in akuten myeloiden Leukämien (AML) und akuten lymphoblastischen Leukämien (ALL) gefunden werden.

**CITED2:**

Das Molekül Cbp/p300-interacting transactivator 2 (CITED2) kompetiert mit den Transkriptionsfaktoren HIF-1 $\alpha$  und STAT2 um die Bindung an die transkriptionellen Koaktivatoren p300/CBP. Es bindet direkt an die CH1-Region in p300/CBP. CITED2 scheint auf diese Weise die HIF-1 $\alpha$ -abhängige Transkription herunter zu regulieren. Die direkte Interaktion zwischen C/EBP $\beta$  und p300 konnte bereits gezeigt werden (Mink *et al.*, 1997). CITED2 könnte analog zu HIF-1 $\alpha$  und STAT2 die Interaktion zwischen C/EBP $\beta$  und p300/CBP abschaffen.

**SRY:**

Bei SRY (sex determining region Y)-box 4 (SOX4) handelt es sich um einen transkriptionellen Aktivator, welcher mit hoher Affinität über seine DNA-bindenden HMG-Box an 5'-AACAAAG-3' Sequenzmotive bindet. Das Protein spielt eine Rolle bei der normalen Entwicklung der Pankreas.

## 4.6 Abschließende Bemerkungen

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur reproduzierbaren Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen auf der Basis einer genom-weiten Expressionsanalyse durchgeführt. Mit ihrer Hilfe konnten neue und bereits bekannte Bindungspartner von verschiedenen Domänen von C/EBP $\beta$  identifiziert, in unabhängigen Interaktionsstudien bestätigt und funktionell charakterisiert werden. Diese erweitern das Verständnis der biologischen Funktion des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$ .

Als Bindungspartner der transaktivierenden Region von C/EBP $\beta$  konnten eine Reihe von Proteinen der Polycomb-Familie, posttranslational modifizierende Enzyme, Moleküle in Signaltransduktionskaskaden und Transkriptionsfaktoren bzw. transkriptionelle Koregulatoren identifiziert werden. Die Identifikation von N-CoR2 als bereits bekanntem Interaktionspartner der TAD diente dabei als positive Bestätigung für die Anwendbarkeit der Methode.

Massenspektrometrische Daten zeigen, dass C/EBP $\beta$  an mindestens zwei Positionen an Lysinresten monomethyliert vorliegen kann. Die Lysin-Methyltransferase G9a wurde als direkter Bindungspartner von C/EBP $\beta$  identifiziert und in unabhängigen Bindungsstudien bestätigt. Aus diesen Einzelbeobachtungen wurde auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen den Proteinen geschlossen. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil an methyliertem C/EBP $\beta$  durch Koexpression von G9a verstärkt wird. Darüber hinaus waren verschiedene trunkierte Varianten von C/EBP $\beta$  ein Substrat für die Methylierung durch G9a *in vitro*. Koexpression von G9a führte zudem zur Repression C/EBP $\beta$ -abhängiger Transkription. Koexpression einer katalytisch inaktiven G9a-Mutante hingegen hatte keinen Einfluß auf die Aktivität von C/EBP $\beta$ . Substituierende Mutationen der methylierbaren Aminosäuren führten zu einer Steigerung der Aktivität des Proteins und zu einem Verlust der Reprimierbarkeit durch G9a. Die Lysin-Methylierung durch G9a führt folglich zur transkriptionellen Repression von C/EBP $\beta$  oder zu einer Inaktivierung des Proteins.

Als C/EBP $\beta$ -interagierendes Protein konnte ausserdem die intrazelluläre Domäne des Notch1-Transmembranrezeptors identifiziert und in einer Reihe von Bindungsstudien bestätigt werden. Der Notch-Signalweg ist an einer Vielzahl entwicklungsbiologischer Prozesse beteiligt und eine Deregulation führt in unterschiedlichen Geweben zu malignen Erkrankungen. Notch1 IC verstärkt die C/EBP $\beta$ -abhängige Transkription in Reportergenstudien und bei der Aktivierung endogener myeloider Gene. Auf der anderen Seite scheint C/EBP $\beta$  der Aktivierung klassischer Zielgene des Notch-Signalweges, wie beispielsweise Hes-1, entgegenzuwirken.

Die SUMOylierung von Transkriptionsfaktoren bringt vielfältige funktionelle, Kontextspezifische Konsequenzen mit sich. C/EBP $\beta$  wird in seiner zentral gelegenen regulatorischen Region SUMOyliert. Proteine der PIAS-Familie wirken dabei als E3-Ligasen, d. h. sie beschleunigen die SUMO-Konjugation. PIAS3 kann darüber hinaus an die SUMOylierte regulatorische Region von C/EBP $\beta$  binden und als transkriptionelles Repressormolekül wirken. Ein Teil des repressiven Effekts ist dabei vermutlich durch Komplexierung von PIAS3 mit Arginin-Methyltransferasen zu erklären.

Die bereits erwähnte Methode zur Identifikation von Interaktionspartnern auf Protein-Microarrays wurde darüber hinaus auf posttranslational modifizierte Formen eines Proteins ausgeweitet. Es konnten Interaktionspartner der regulatorischen Region von C/EBP $\beta$  identifiziert werden, deren Bindung von dem SUMOylierungsstatus des Proteins abhängig ist. Dabei konnten Chromatin-assoziierte Faktoren wie MBD1 oder das Trithorax-Protein mit Lysin-Methyltransferaseaktivität MLL2 als Bindungspartner der regulatorischen Domäne von C/EBP $\beta$  isoliert werden.

## Anhang

Nr.	X-Koord.	Y-Koord.	Accession Number	Identität (%)	Beschreibung nach UniGene Datenbank	Treffler
1	181	197/200	NM_006412	100	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (AGPAT2), transcript variant 1	1
2	239/236	213/214	BF673976	96,6	802137363F1 NIH_MGC_83 cDNA clone IMAGE:4274102	1
3	151	197/200	BG033629	100	602301756F1 NIH_MGC_87 cDNA clone IMAGE:4403270	1
4	116	47/50	AB208804	99,8	Adapter-related protein complex 3 delta 1 subunit variant protein	1
5	72/5	179/180	CF466406	98,7	AGENCOURT_15337557 Anterior Hom cDNA clone IMAGE:30515013	1
6	147/150	224/225	CV812269	100	AGENCOURT_36397398 NIH_MGC_280 cDNA clone IMAGE:7502919	3
7	217	221/223	BM478787	100	AGENCOURT_6400598 NIH_MGC_72 cDNA clone IMAGE:5526877	1
8	231	142/145	BM548439	97,5	AGENCOURT_6573386 NIH_MGC_124 cDNA clone IMAGE:5731930	1
9	105/104	211/214	BU196357	100	AGENCOURT_6925114 NIH_MGC_110 cDNA clone IMAGE:5952469	1
10	7/10	124/125	B0646218	99,5	AGENCOURT_8490545 NIH_MGC_100 cDNA clone IMAGE:6293838	2
11	103/104	232/235	AB191264	99,6	AGRN mRNA for agrin	1
12	107/110	174/175	AY172958	97,4	anti-rabies SOJB immunoglobulin heavy chain mRNA	1
13	151/154	223/224	NM_020038	99,7	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3 (ABCC3), transcript variant MRP3B	1
14	97/100	159/160	AB208876	99,3	Axin 1 isoform a variant protein	1
15	169/166	213/214	AB209588	99,6	Beta adrenergic receptor kinase 1 variant protein	1
16	214/211	198/199	NM_001804	97,6	Caudal type homeo box transcription factor 1 (CDX1)	1
17	94/81	163/164	BG073825	99,8	cDNA clone IMAGE:6085949, partial cds	2
18	19/16	213/214	B0040520	98,5	cDNA clone MGC:39505 IMAGE:5295140	1
19	204/201	173/174	AL832088	100	cDNA DKF Zp31301831 (from clone DKF Zp31301831)	1
20	139/136	98/99	AL122043	100	cDNA DKF Zp56661424 (from clone DKF Zp56661424)	1
21	24/21	218/219	C9336736	96,5	cDNA DKF Zp686614106 (from clone DKF Zp686614106)	1
22	52/55	184/185	AK022087	99,5	cDNA FLJ12025 fis, clone HEMBB1001802, highly similar to desmin	1
23	114/111	198/199	AK024232	98,2	cDNA FLJ14170 fis, clone NT2RP2002105, highly similar to melanocyte stimulating hormone receptor	1
24	114/111	188/189	AK027561	99,8	cDNA FLJ14655 fis, clone NT2RP2002292	1
25	131	207/210	AK122912	100	cDNA FLJ16589 fis, clone TEST14001441	1
26	111	157/160	AK000366	99,2	cDNA FLJ20359 fis, clone HEP16626	1
27	76/79	156	AK000381	100	cDNA FLJ20374 fis, clone HU000348	1
28	161	127/15	AK026585	100	cDNA FLJ30326 fis, clone BRACE2007174, moderately similar to ZINC FINGER PROTEIN 84	1
29	116/119	86	AK054888	99,7	cDNA FLJ30326 fis, clone BRACE2007174, moderately similar to ZINC FINGER PROTEIN 84	1
30	219/216	203/204	AK091257	99,2	cDNA FLJ33938 fis, clone CTONG2017998	1
31	149/146	178/179	AK092341	99,7	cDNA FLJ35022 fis, clone OCBBF2015031, highly similar to zinc finger protein (ZF5128)	1
32	4/1	223/224	AK097127	97,6	cDNA FLJ39808 fis, clone SPLEN2009081	1
33	9/6	233/234	AK126692	99,7	cDNA FLJ44738 fis, clone BRACE3026947	1
34	71/74	166	AK127216	100	cDNA FLJ45283 fis, clone BRHIP3001878, highly similar to peptide transporter 3 (PHT2)	1
35	151	77/10	AK127960	100	cDNA FLJ46072 fis, clone TEST11000459	1
36	175/172	79/80	AK128477	98,4	cDNA FLJ46622 fis, clone TLUNG2001600, highly similar to Ig gamma-4 chain C region	1
37	16	112/115	AK128652	96,9	cDNA FLJ46811 fis, clone TRACH3036103, moderately similar to Ig heavy chain Y-III region VH26 precursor	2
38	165/164	236/239	AK074646	99,5	cDNA FLJ50165 fis, clone MAMMA1000106	1
39	146/149	61	NM_002768	99,4	Chromatin-modifying protein 1a	1
40	85/82	104/105	NM_005189	100	Chromobox homolog 2 (Pc class homolog, Drosophila) (CBX2), transcript variant 1	1
41	204/201	88/89	AF418290	100	clone 15 myosin XVBF (MYO15B) pseudogene, partial sequence	1
42	111	222/225	C9396478	100	cDNA FLJ46811 fis, clone TRACH3036103, moderately similar to Ig heavy chain Y-III region VH26 precursor	14
43	70/67	129/130	NM_013594	100	Discoidin domain receptor family, member 1 (DDR1), transcript variant 3	1
44	79/76	208/209	NM_004393	98,8	Dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1) (DAG1)	1

Tab. 3.1 (Teil 1): Interaktionspartner der PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 Proteinsonde auf dem Protein-Macroarray.

Nr.	X-Koord.	Y-Koord.	Accession Number	Identität (%)	Beschreibung nach UniGene Datenbank	Treffer
45	9/6	8/9	AF229245	100	Egln nine homolog 1, SM-20	1
46	36	107/110	AB051895	97.2	EPK1 mRNA for epiplakin 1	1
47	69/66	203/204	NM_178225	99	F-box and WD-40 domain protein 5 (FBXW5), transcript variant 2	1
48	179/176	118/119	NM_003890	98.8	Fc fragment of IgG binding protein (FCGBP)	4
49	41	117/120	AK024450	100	FLJ00042 protein, partial cds	1
50	236/239	171	AK074134	100	FLJ00207 protein	1
51	170/169	166/169	CR600069	99.5	full-length cDNA clone CSDDF034YL11 of Fetal brain	1
52	91	227/230	CR625911	99	full-length cDNA clone CSDDN002YB07 of Adult brain	1
53	41	227/230	CR625605	98.4	full-length cDNA clone CSDDN004YD11 of Adult brain	2
54	131	192/195	AB208902	99.8	Fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma) isoform a variant protein	1
55	90/87	169/170	AB043702	99.8	FZD5 mRNA for seven-transmembrane receptor Frizzled-5	1
56	89/86	223/224	BC018740	100	Heat shock 70kDa protein 1A (cDNA clone MGC:31885 IMAGE:4906865)	1
57	234/231	228/229	BC063507	95.8	Heat shock 70kDa protein 1B (cDNA clone MGC:74463 IMAGE:4153196)	5
58	124/121	218/219	M85289	100	Heparan sulfate proteoglycan (HSPG2)	1
59	236/239	196/196	NM_032019	99.7	Histone deacetylase 10 (HDAC10)	1
60	136/139	176	AB209433	100	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9 specific 3 (HLA-B associated transcript 8) isoform a variant	1
61	29/26	218/219	BC040948	100	Hoxbox protein Hox-A11 (cDNA clone MGC:48802 IMAGE:5587615)	1
62	46	227/230	NM_024829	99.4	hypothetical protein FLJ22862 (FLJ22862)	1
63	36	127/130	XM_291222	99.8	Integrator complex subunit 1, transcript variant 1 (INTS1)	1
64	67	96/98	NM_014851	97.5	Kelch-like 21 (Drosophila) (KLHL21)	1
65	126	157/160	BC026319	100	Kelch-like 26 (Drosophila) (cDNA clone MGC:26163 IMAGE:4799495)	1
66	22/25	174/175	NM_003685	99.2	KH-type splicing regulatory protein (FUSE binding protein 2) (KHSRP)	1
67	7/10	174/175	AB007932	99.8	KIAA0463 protein, partial cds	1
68	89/86	38/39	AB014581	100	KIAA0681 protein, partial cds (Lethal(3)malignant brain tumor-like protein)	1
69	74/71	178/179	AB023180	99.1	KIAA0963 protein, partial cds	1
70	13/14	47/50	AB075844	100	KIAA1964 protein	1
71	136	182/185	NM_005560	99.7	Laminin, alpha 5 (LAMA5)	1
72	113/114	42/45	NM_003573	100	Latent transforming growth factor beta binding protein 4 (LTBP4)	3
73	206	47/50	NM_024036	100	Leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 4 (LRFN4)	1
74	121	137/140	NM_002332	100	Low density lipoprotein-related protein 1 (alpha-2-macroglobulin receptor) (LRP1)	1
75	204/201	183/184	NM_005940	99.8	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3) (MMP11)	1
76	29/26	183/184	NM_018270	99.1	MRG-binding protein, Chromosome 20 open reading frame 20 (C20orf20)	1
77	154/151	148/149	NM_002457	100	Mucin 2, intestinal/tracheal (MUC2)	1
78	156/153	231	CB044178	99.1	MISC: g03a01: x1 NC1 CGAP Co17 cDNA clone IMAGE:3217440	3
79	239/236	163/164	NM_017617	98	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila) (NOTCH1)	1
80	84/81	138/139	NM_000435	99.3	Notch homolog 3 (Drosophila) (NOTCH3)	1
81	21/24	151	NM_004555	99.8	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3 (NFATC3), transcript variant 2	1
82	219/216	158/159	AF087856	99.8	Nuclear receptor co-repressor (NCOR)	1
83	192	196/198	NM_006312	99	Nuclear receptor co-repressor 2 (NCOR2)	1
84	1	142/145	AF517673	100	Peroxisomal proliferator-activated receptor A, interacting complex-285 peptide (PRIC285)	1
85	228/229	157/160	NM_201380	89.1	Plectin 1, intermediate filament binding protein 500kDa (PLEC1), transcript variant 6	4
86	234/231	168/169	NM_015103	100	Plexin D1 (PLXND1)	1
87	56	237/240	XM_458167	99.8	PREDICTED: Hypothetical protein DKFZps47K054 (DKFZps47K054)	2
88	174/171	163/164	XM_370696	100	PREDICTED: Hypothetical protein FLJ34236 (FLJ34236)	1

Tab. 3.1 (Teil 2): Interaktionspartner der PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 Proteinsonde auf dem Protein-Macroarray.

Nr.	X-Koord.	Y-Koord.	Accession Number	Identität (%)	Beschreibung nach UniGene Datenbank	Treffer
89	174/171	138/139	XM_378973	93,7	PREDICTED: Hypothetical protein LOC284801 (LOC284801)	1
90	31	112/115	XM_379774	95,4	PREDICTED: KIAA1856 protein (KIAA1856)	3
91	104/101	178/179	XM_039877	99,8	PREDICTED: Mucin 5, subtype B, tracheobronchial (MUC5B)	2
92	43/44	232/235	XM_371034	91,6	PREDICTED: Similar to Elongation factor 1u, mitochondrial precursor (EF-1u) (P43) (LOC388361)	2
93	147/150	239/240	XM_292982	92,2	PREDICTED: Similar to protein expressed in prostate, ovary, testis, and placenta 15, transcript variant 1 (LOC653269)	1
94	146	162/165	Z74815	99,5	Pre-pro-alpha1(I) collagen	2
95	90/87	149/150	AB209854	100	Pro-alpha-1 type V collagen variant protein	1
96	159/156	123/124	AY232290	99,7	Proliferation-inducing gene 2	1
97	66/69	176	NM_176887	98,9	Proline rich 15 (PRR15)	1
98	63/64	222/225	NM_033238	99,8	Promyelocytic leukemia (PML), transcript variant 1	1
99	94/91	233/234	BC007612	99,7	Prosapin (variant Gaucher disease and metachromatic leukodystrophy) (cDNA clone MGC:15695 IMAGE:3351606)	1
100	106	137/140	AB209430	100	Protein O-mannosyltransferase 1 variant protein	1
101	12	21/23	NM_002840	99,8	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, F (PTPRF), transcript variant 1	1
102	167/170	9/10	BC051360	99,6	RAB11 family interacting protein 3 (class II), mRNA (cDNA clone MGC:59778 IMAGE:6646253)	1
103	29/26	193/194	NM_013400	100	Replication initiator 1 (REPIN1), transcript variant 1	2
104	79/76	198/199	BC095427	99,7	Ribosomal protein L4 (cDNA clone MGC:110964 IMAGE:30711782)	1
105	193/194	117/120	NM_058192	100	RNA pseudouridylate synthase domain containing 1 (RPUSD1)	1
106	159/156	178/179	NM_153334	99,4	Scavenger receptor class F, member 2 (SCARF2), transcript variant 1	1
107	159/156	168/169	NM_001001852	99	Serine/threonine-protein kinase Pim-3 oncogene (PIM3)	1
108	71	42/45	AB209061	100	Serum amyloid A activating factor 2 variant protein	1
109	61	57/60	BC068567	99,8	similar to RIKEN cDNA A230078D05 gene (cDNA clone IMAGE:5275321)	1
110	31/34	206	NM_006632	99,7	Small optic lobes homolog (Drosophila) (SOLH)	1
111	22/25	239/240	NM_001014291	100	Small proline-rich protein 2G (SPRR2G)	5
112	169/166	148/149	NM_0010046	100	Solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2 (SLC12A2)	1
113	195/192	149/150	NM_198935	99,8	Synovial sarcoma translocation gene on chromosome 18-like 1 (SS18L1), transcript variant 1	1
114	176	27/30	X97548	100	TIF1beta zinc finger protein	1
115	196	37/40	X02812	100	Transforming growth factor-beta (TGF-beta)	1
116	171	152/155	AF018081	100	Type XVIII collagen (COL18A1) mRNA, alternatively spliced, long form	3
117	44/41	193/194	BM689499	98,5	UI-E-DX1-agx-h-21-U1.s1 UI-E-DX1 cDNA clone UI-E-DX1-agx-h-21-U1	1
118	179/176	138/139	BM701226	99,3	UI-E-EJ0-ahj-t-20-U1.r1 UI-E-EJ0 cDNA clone UI-E-EJ0-ahj-t-20-U1	1
119	209/206	133/134	AW136775	100	UI-H-B1-ace-e-01-U1.s1 NCL CGAP Sub3 cDNA clone IMAGE:2714185	1
120	219/216	163/164	NM_023929	99,7	Zinc finger and BTB domain containing 10 (ZBTB10)	1
121	56	217/220	NM_015117	99,2	Zinc finger CCHC-type containing 3 (ZC3H3)	1
122	166/169	206	NM_003414	99,8	Zinc finger protein 267 (ZNF267), transcript variant 498723	1

**Tab. 3.1 (Teil 3): Interaktionspartner der PKA-C/EBP $\beta$  CR1-4 Proteinsonde auf dem Protein-Macroarray.** Insgesamt konnten 122 Interaktionen einer Referenz Accession Number in der UniGene Datenbank zugeordnet werden. X- und Y-Koordinaten geben die absolute Filterposition an. Die Anzahl der Treffer gibt an, wie oft ein Protein als Interaktionspartner auf dem Filter identifiziert werden konnte.

Mr.	X-Koord.	Y-Koord.	Accession Number	Identität (%)	Beschreibung nach UniGene Datenbank	Treffer
1	148	22	NM_001109	99,5	A disintegrin and metalloproteinase domain 8 (ADAM8)	1
2	196	62	AB_208804	66,2	Adapter-related protein complex 3 delta 1 subunit variant protein	1
3	41	72	NM_007247	99,0	AP-1 gamma subunit binding protein 1 (AP1GBP1), transcript variant 1	1
4	33	142	AF_220656	100,0	Apoptosis-associated nuclear protein PHLDA1 (PHLDA1), partial cds	1
5	180	74	NM_001006940	100,0	Asparagine-linked glycosylation 3 homolog (yeast, alpha-1,3-mannosyltransferase) (ALG3), transcript variant 3	1
6	176	116	NM_004079	100,0	Cathepsin S (CTSS)	1
7	96	181	CR597101	100,0	cDNA clone CS001030YP.01 of Placenta Cot 25-normalized	1
8	6	217	AF582954	85,3	cDNA clone IMAGE:2227140	1
9	123	82	BF939514	94,0	cDNA clone IMAGE:3440410 3' similar to TR-09RTA4-09RTA4 GAMMA1 HEAVY CHAIN OF MAB7	1
10	193	137	BC_014470	100,0	cDNA clone IMAGE:4866070, with apparent retained intron	1
11	204	27	BC_073825	99,8	cDNA clone IMAGE:6085949, partial cds	1
12	96	53	AL136730	100,0	cDNA DKF Zp434H2010	1
13	86	37	BX537939	93,3	cDNA DKF Zp686F06102	1
14	127/106	141/8	EX647923	99,5	cDNA DKF Zp686M0819	2
15	32	217	AL137722	100,0	cDNA DKF Zp761O051	1
16	35	151	CR627251	99,1	cDNA DKF Zp781H1423	1
17	47	157	AK122708	100,0	cDNA FLJ16189 fs, clone BRTHA2012714, highly similar to SKELETAL MUSCLE LIM-PROTEIN 1	1
18	188	32	AK131566	100,0	cDNA FLJ16818 fs, clone TRACH1000193, highly similar to Orphan nuclear receptor HMR	1
19	140	14	AK074377	100,0	cDNA FLJ23797 fs, clone HEP22157, highly similar to nuclear zinc finger protein Np95 (UHRF1)	1
20	189	52	AK091166	100,0	cDNA FLJ33647 fs, clone CTONG 2005399, weakly similar to ZINC FINGER PROTEIN 195	1
21	236	53	AK092741	98,8	cDNA FLJ35422 fs, clone SMINT2001222	1
22	186	61	AK128205	76,9	cDNA FLJ46337 fs, clone TEST14046245	1
23	112/3182/197	81/108/57/51	AK128421	97,9	cDNA FLJ46564 fs, clone THYMU3040746, highly similar to Ig gamma-2 chain C region	3
24	110	146	AK128652	99,4	cDNA FLJ46811 fs, clone TRACH3036103, moderately similar to Ig heavy chain V-JII region VH26 precursor	1
25	58/124/148/126	7/32/102/181	Y11307	99,8	CYR61	4
26	63	107	NM_001961	97,2	Eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2)	1
27	222	112	AK090464	95,6	FLJ00365 protein	1
28	201	32	AK090471	100,0	FLJ00392 protein	1
29	189	93	BC_042684	100,0	Hypothetical protein FLJ31951 (cDNA clone MGC:42676 IMAGE:4826810)	1
30	167	32	AF_076494	99,7	Interferon regulatory factor 7H (IRF7), alternatively spliced	1
31	129	43	AB_011124	100,0	KIAA0552 protein, partial cds	1
32	122	191	AB_040935	99,2	KIAA1502 protein, partial cds	1
33	382/31	17/148	NM_000428	100,0	Latent transforming growth factor beta binding protein 2 (LTBP2)	2
34	157	57	NM_015846	100,0	Methyl-CpG binding domain protein 1 (MBD1), transcript variant 1	1
35	178	127	NM_052897	100,0	Methyl-CpG binding domain protein 6 (MBD6)	1
36	166	228	AB_208645	99,7	Methylolonyl Coenzyme A mutase precursor variant protein	1
37	43	127	AB_208121	100	Mutant p53 binding protein 1 variant protein	1
38	135/181	121/28	NM_003482	99,6	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2 (MLL2)	2
39	144	13	AY648036	99,7	Myotonic dystrophy kinase-related CDC42-binding kinase gamma	1
40	29	3	BC_002669	99,5	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6 (cDNA clone IMAGE:3608765), partial cds	1
41	173	127	XM_029353	100	PREDICTED: KIAA1509	1
42	46	73	XM_370567	89,6	PREDICTED: KIAA1975 protein similar to MRIP2	1
43	82	24	XM_496202	95	PREDICTED: Similar to keratin 17 (LOC440421)	1
44	73	207	XM_496278	99,7	PREDICTED: Zinc finger protein 516 (ZNF516)	1
45	88	17	AB_208664	99,4	Pro-alpha-1 type V collagen variant protein	1
46	30	179	NM_002768	99,5	Procollagen (type III) N-endopeptidase (PCOLN3)	1
47	139/117	23/32/32	BC_007612	100	Prosaposin (variant Gaucher disease and variant metachromatic leukodystrophy) (cDNA clone MGC:15895 IMAGE:3351606)	1
48	59	152	NM_033046	99,5	Rhetein (RTRN), transcript variant 2	1
49	195	116	BC_039299	100	Similar to stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70Hsp90-organizing protein), clone IMAGE:4630381	1
50	226	26	NM_001014291	98,7	Small proline-rich protein 2G (SPRR2G)	1
51	177	222	NM_003128	99,7	Spectrin, beta, non-erythrocytic 1 (SPTBN1), transcript variant 1	1
52	166/65	48/164	AF_018081	99,5	Type XVII collagen (COL18A1), long form	2
53	240	216	NM_002467	99,6	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (MYC)	1

**Tab. 3.3: Interaktionspartner der PKA-C/EBPβ CR567 Proteinsonde in ihrer nicht-SUMOylierten Form.** 53 Bindungspartner wurden nur von der nicht-SUMOylierten Sonde (PKA-C/EBPβ CR567) erkannt. Die X- und Y-Koordinaten geben die absoluten Filterpositionen an. Die Referenz Accession Nummer bezieht sich auf die UniGene Datenbank.



Nr.	X-Koord.	Y-Koord.	Accession Number	Identität (%)	Beschreibung nach UniGene Datenbank	Treffer
1 207			BM917451	100.0	AGENCOURT_6806710 NH_MGC_106 cDNA clone IMAGE5483970	2
2 16/65/211	203/736/58	62	AB191254	100.0	Aggrin	2
3 97/219	57/27		BC067892	99.9	Ankyrin repeat domain 1b (cDNA clone IMAGE5275012), with apparent retained intron	2
4 154	197		B0734525	96.2	cDNA clone U1E-C11-aq-fn-13-OU1	2
5 206	153		AL834410	100.0	cDNA D1F7G647M044	2
6 175	86		AL122043	100.0	cDNA D1F7G666G1434	2
7 197/202	124/192		BC146769	99.3	cDNA D1F7G666M2044	2
8 202	227		AK024151	98.5	cDNA FLJ114123 ts, clone MAMMA1002617, weakly similar to ZINC FINGER PROTEIN 135	2
9 196	118		AK131441	100.0	cDNA FLJ116574 ts, clone TESOP2006396	2
10 1507/01/65	221/42/169		AK122903	99.9	cDNA FLJ116574 ts, clone TESOP2006396	2
11 181	143		AK093924	99.9	cDNA FLJ36605 ts, clone TRACH2015316, weakly similar to EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR KINASE SUBSTRATE EPS8	2
12 197	51		AK128477	96.4	cDNA FLJ36605 ts, clone TRACH2015316, highly similar to VIMENTIN	2
13 23	137		AK024865	99.0	cDNA FLJ21212 ts, clone TLONG2001600, highly similar to Ig gamma-4 chain C region	2
14 176/207	146/179		BC016402	100.0	cDNA FLJ21212 ts, clone COL005602	3
15 90/156	186/67		BC035140	92.9	clone IMAGE5264126	4
16 62/126/10	134/2281		BC087839	100.0	Connective tissue growth factor (cDNA clone MGC102839 IMAGE6181580)	4
17 56/232/101/26/187/17/27/100/182	237/182/21/16/7/1192/127/116/174		CF995478	100.0	CF995478 RZPD no.3017 cDNA clone RZPDG9017F1136	9
18 68	232		NM_078467	99.9	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A), transcript variant 2	2
19 147	202		NM_013994	100.0	Discodin domain receptor family, member 1 (DDR1), transcript variant 3	2
20 17/237	87/132		AK024501	100.0	FLJ00070 protein, partial cds	4
21 101	49		BC077728	99.9	FLJ00110 protein, partial cds	2
22 125	199		NM_005644	85.9	Hypothetical protein LOC126208 (cDNA clone MGC78664 IMAGE6210543)	2
23 203	237		AB039370	99.9	Insulin receptor substrate 1 (IRS1)	2
24 46	36		NM_003573	99.7	Jagged 2 isoform b precursor variant protein	2
25 181/46/01/136/156	197/52/21/6/7/97		AB039370	99.7	Latent transforming growth factor beta binding protein 4 (LTBP4)	6
26 166/167	43/151		NM_000435	100.0	Notch homolog 3 (Drosophila) (NOTCH3)	3
27 216	52		AB029008	100.0	Notch homolog 3 (Drosophila) (NOTCH3)	2
28 86	122		AB029572	80.2	Palmitoyl-protein thioesterase 2 isoform c precursor variant protein	2
29 13	237		NM_000299	100.0	Plakophilin 1 ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome (PKP1), transcript variant 1b	2
30 75/111	17/592		XM_371474	100.0	PREDICTED: Hsxn B2 [PLXNB2]	3
31 76	196		XM_379625	92.8	PREDICTED: Similar to ubiquitin A52 residue ribosomal protein fusion product 1 (LOC401495)	2
32 177/181	176/151		Z74615	99.7	Pro-alpha1(I) collagen	3
33 60/200/192	81/131/237		AF231024	100.0	Protocadherin Flamingo 2 (FM2)	4
34 145	41		NM_014766	100.0	Pro-glycine nucleotide exchange factor (GEF)17 (ARHGAP17)	2
35 452/0/14	56/156/33		NM_182706	100.0	Scrubbed homolog (Drosophila) (SCRIB), transcript variant 1	5
36 146	103		NM_181642	99.0	Serine protease inhibitor, Kunitz type 1 (SPINT1), transcript variant 1	2
37 174/239	214/169/213		AB029061	100.0	Serum amyloid A activating factor 2 variant protein	6
38 87/157/69/74/11/65/34/122	129/174/68/2/53/2/189		NM_196843	99.9	Surfactant, pulmonary-associated protein B (SFTPB), transcript variant 2	11
39 22/222	2/107		NM_003246	99.5	Thrombospondin 1 (THBS1)	3
40 155/77	129/107		NM_015898	100.0	Zinc finger and BTB domain containing 7A (ZBTB7A)	2

**Tab. 3.4: Interaktionspartner der PKA-C/EBP $\beta$  CR567 Proteinsonde in ihrer SUMOylier-ten und nicht-SUMOylierten Form.** 40 Bindungspartner wurden von beiden Sonden detek-tiert (PKA-C/EBP $\beta$  CR567 und PKA-C/EBP $\beta$  CR567-SUMO-1). Die X- und Y-Koordinaten geben die absoluten Filterpositionen an. Die Referenz Accession Nummer bezieht sich auf die UniGene Datenbank.

Nr.	X-Koord.	Y-Koord.	Accession Number	Identität (%)	Beschreibung nach UniGene Datenbank	Treffer
1	109	27	AY423763	83.4	Actinlin	1
2	157/159/89	151/18/63	CV809835	97.8	AGENCOURT_36388643 NIH_MGC_281 cDNA clone IMAGE:7505875	3
3	24	12	BM478787	100.0	AGENCOURT_6400588 NIH_MGC_72 cDNA clone IMAGE:5526877	1
4	237	114	BM555523	85.5	AGENCOURT_6577838 NIH_MGC_41 cDNA clone IMAGE:5470527	1
5	71	227	AF136185	100.0	Atypical PKC isotype-specific interacting protein long variant	1
6	97	227	NM_004327	95.8	Breakpoint cluster region (BCR), transcript variant 1	1
7	165	1	NM_001753	100.0	Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa (CAV1)	1
8	194	203	NM_006079	95.2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2 (CITED2)	1
9	137	177	AI680792	90.1	cDNA clone IMAGE:2271513 3' similar to TR:Q15834 Q15834 HEPATITIS DELTA ANTIGEN INTERACTING PROTEIN A	1
10	136	167	CR933614	100.0	cDNA DKFp686L0243	1
11	185	19	AK000439	95.1	cDNA FLJ20432 fs, clone KAT03764	1
12	240	89	AK025905	80.6	cDNA FLJ22252 fs, clone HRC02734	1
13	177	77	AK098778	95.8	cDNA FLJ25912 fs, clone CBR04752, highly similar to FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE A (EC 4.1.2.13)	1
14	196	198	AK124583	85.8	cDNA FLJ2592 fs, clone BRACE3009747	1
15	110	39	AY359095	100.0	Clone DNA97013 HS3ST2 (UNQ2442)	1
16	23	2	BC036656	100.0	Clone IMAGE:4828620	1
17	145	116	AB209064	97.8	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2 variant protein	1
18	149	198	X63556	95.5	Fibrillin	1
19	90	221	AK131097	100.0	FLJ00321 protein	1
20	132/44/144/67	51/113/227/86	BC063507	96.6	Heat shock 70kDa protein 1B (cDNA clone MGC:74463 IMAGE:4153196)	4
21	208	187	AB209117	88.3	HLA class I histocompatibility antigen, A-1 alpha chain precursor variant protein	1
22	236	137	NM_020340	88.1	KIAA1244	1
23	140/16	101/88	NM_178839	100.0	Leucine rich repeat transmembrane neuronal 1 (LRRTM1)	2
24	45	46	NM_017458	95.8	Major vault protein (MVP), transcript variant 1	1
25	113	102	XM_498167	100.0	PREDICTED: Hypothetical protein DKFp547K054	1
26	86/119	53/213	XM_495877	100.0	PREDICTED: Hypothetical protein DKFp762N1910	2
27	149	88	XM_379774	100.0	PREDICTED: KIAA1856 protein	1
28	22	231	XM_208313	97.1	PREDICTED: Similar to tropomyosin 4 (LOC285321)	1
29	142	212	NM_002840	95.3	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, F (PTPRF), transcript variant 1	1
30	139	33	NM_153334	95.8	Scavenger receptor class F, member 2 (SCARF2), transcript variant 1	1
31	221/7	122/104	BC073936	95.1	Similar to RIKEN C030006k11 gene (cDNA clone MGC:90446 IMAGE:5223300)	2
32	139	223	NM_003107	100.0	SRY (sex determining region Y)-box 4 (SOX4)	1
33	129	208	NM_020457	80.8	THAP domain containing 11 (THAP11)	1
34	223/22	2/107	NM_003246	95.5	Thrombospondin 1 (THBS1)	3
35	22	107	NM_003247	95.8	Thrombospondin 2 (THBS2)	1

**Tab. 3.5: Interaktionspartner der PKA-C/EBP $\beta$  CR567 Proteinsonde in ihrer SUMOylier-ten Form.** 35 Bindungspartner wurden nur von der SUMO-modifizierte Sonde erkannt (PKA-C/EBP $\beta$  CR567-SUMO-1). Die X- und Y-Koordinaten geben die absoluten Filterpositionen an. Die Referenz Accession Nummer bezieht sich auf die UniGene Datenbank.

## Danksagung

Alle Experimente wurden am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin, durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Achim Leutz für meine Aufnahme als Doktorand in seine Arbeitsgruppe am MDC und für die problemlose Finanzierung der Promotionszeit. Darüber hinaus möchte ich mich für seine lockere und umgängliche Art der Interaktion bedanken, die mir die Chance zur wissenschaftlichen und persönlichen Entfaltung in dieser intensiven Zeit ermöglicht hat.

Desweiteren danke ich Frau Dr. Elisabeth Kowenz-Leutz für die intensive Zusammenarbeit und die Einführung in Zellkultur-Experimente, Reporter-genstudien und Northern-Analysen. Herrn Dr. Jörn Lausen möchte ich für die Hilfe bei Reporter-genstudien und Interaktionsstudien danken. Ich habe sehr von seinen Erfahrungen in verschiedenen Laboren profitieren können und bin ihm dankbar für die Etablierung unterschiedlicher Techniken im Labor. Frau Dr. Valerie Begay-Müller möchte ich für die Bereitstellung von MEF danken. Bei Frau Dr. Jeske Slink bedanke ich mich für zahlreiche interessante wissenschaftliche Diskussionen. Frau Karoline Friedrich danke ich für die exzellente technische Unterstützung während der letzten Phase meiner Arbeit. Allen nicht namentlich genannten gegenwärtigen und vergangenen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Leutz möchte ich für die aussergewöhnliche Zeit am Max-Delbrück-Centrum danken.

Ich danke Prof. Dr. Udo Heinemann für die Bereitstellung des Gankyrin-Expressionsvektor. Ferner bedanke ich mich bei Dr. Jörg Huelsen für die Bereitstellung des Lef1 Expressionsvektors. Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. Martin J. Walsh für die Bereitstellung diverser G9a Expressionsvektoren, welche mir die Arbeit sehr erleichtert haben. Frau Alexandra Sapetschnig und Dr. Guntram Suske danke ich für die Bereitstellung von rekombinantem Sp3-Protein und prokaryotischen PIAS-Expressionsvektoren. Darüber hinaus möchte ich mich für ihre Unterstützung bei der *in vitro* SUMOylierung bedanken.

Mein Dank geht ferner an Herrn Dr. Markus Vogt, dessen Hilfestellungen für meine wissenschaftliche Entwicklung von großer Bedeutung waren. Herrn Dr. Constantin Rüder danke ich für das genaue und kritische Durchsehen der Arbeit. Viele seiner Verbesserungsvorschläge sind in das Manuskript aufgenommen worden.

Von herausragender Bedeutung für das Gelingen dieser Doktorarbeit war der Arbeitseinsatz von Frau Maria Knoblich, von deren langjähriger Erfahrung im Bereich der Proteinbiochemie ich sehr profitiert habe. Unter anderem hat sie grundlegende Techniken zur SUMOylierung im Labor etabliert, welche ich für nachfolgende Experimente nutzen konnte. Darüber hinaus habe ich sehr von ihrem Arbeitseinsatz profitiert und nicht zuletzt einen vertrauenswürdigen Partner bei der täglichen Arbeit gefunden.

Ich danke Herrn Dr. Walter Kleine-Homann und Herrn Dr. Hans-Ullrich Rogall für den ursprünglichen Ansporn zur Anfertigung dieser Doktorarbeit.

Abschließend möchte ich Maren Regener, meinen Eltern Helga und Rolf Pleß sowie meiner Familie für den bedingungslosen Rückhalt in meinem Leben danken. Insbesondere danke ich auch meinem Bruder Thomas Schwarz-Eichling, ohne den ich nie so weit gekommen wäre.

## **Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt wurde und ich die Stellen der Arbeit, die anderen Werken in Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe. Diese Dissertation wurde noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegt.

Berlin, 13. August 2007

## Lebenslauf

## Ole Pleß

Lübecker Strasse 26  
10559 Berlin  
030-39807400  
opless@gmx.de

### Persönliche Daten

Geburtsdatum: 15.12.1976  
Geburtsort: Hamburg  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: Ledig, keine Kinder

### Doktorarbeit

Seit 10/2002:  
**Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin**  
Labor Prof. Dr. Leutz  
Abteilung Tumorgenese und Zelluläre Differenzierung  
Thema: Identifikation und Charakterisierung von Protein-Interaktionspartnern des Transkriptionsfaktors CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\beta$

### Diplomarbeit

08/2001 - 04/2002:  
**Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg**  
Labor Prof. Dr. Elisabeth Schwarz  
Abteilung Angewandte Tumorstudiologie  
Thema: Analyse der zellulären Lokalisation des krebs-assoziierten Zinkfinger-Proteins APM-1

### Hauptstudium

04/1999 - 04/2002:  
**Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg**  
Hauptfach Molekularbiologie (Diplomnote 1,0)  
Nebenfach Biochemie (Diplomnote 1,3)  
Nebenfach Informatik (Diplomnote 1,3)

### Grundstudium

04/1997 - 03/1999:  
**Universität Hamburg**  
Vordiplom Studiengang Biologie-Diplom  
(Vordiplomnote „gut“)

### Schulbildung

08/1986 - 07/1995:  
Helene-Lange-Gymnasium Hamburg  
Abitur (Abiturnote 1,5)

### Stipendium

10/1999 - 09/2000:  
Stipendiat der Studienstiftung der Aventis Foundation

### Forschungs-aufenthalt

08/2000 - 12/2000:  
**University of Dundee (Schottland)**  
Labor Prof. Dr. Angus Lamond, Abteilung Genregulation  
Thema: Charakterisierung der Proteine des Nukleolus

### Konferenzteil-nahmen

08/2004:  
6<sup>th</sup> EMBL Transcription Meeting, Heidelberg

03/2004:  
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie,  
Berlin

**Berufserfahrung**

2000 - 2001:  
Hilfswissenschaftler  
Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg  
Labor Prof. Dr. Martin Vingron, Abteilung Bioinformatik und  
Labor Prof. Dr. Elisabeth Schwarz, Abteilung Angewandte  
Tumorstudiologie

10/1995 - 10/1996:  
Zivildienst Deutsches Rotes Kreuz, Hamburg

Berlin, 13. August 2007

## Veröffentlichungen

Jörn Lausen, Fransisca Leonard, Ole Pless and Achim Leutz. Tal1 regulates ubiquitinylation in erythrocyte development. *Manuscript in preparation*.

Ole Pless, Elisabeth Kowenz-Leutz, Maria Knoblich, Michiel Vermeulen, Matthias Mann and Achim Leutz. The transcription factor C/EBP $\beta$  is lysine methylated and repressed by G9a. *Manuscript in preparation*.

Ole Pless, Elisabeth Kowenz-Leutz and Achim Leutz. The transcription factor C/EBP $\beta$  is a target for Notch1 signaling. *Manuscript in preparation*.

Ole Pless, Elisabeth Kowenz-Leutz, Maria Knoblich, Michiel Vermeulen, Matthias Mann and Achim Leutz. Methylation of C/EBP $\beta$  by G9a lysine-methyltransferase leads to transcriptional repression. *Poster presentation at the Summer School 2007: Signal transduction & transcriptional regulation in cancer (HGF research program „Cell and Tumour Biology“), Groß Döln.*

Ole Pless, Maria Knoblich and Achim Leutz. Modulation of C/EBP $\beta$  transcriptional activity by SUMO/PIAS. *Poster presentation at the Summer School 2005: Signalling in cancer (HGF research program „Cell and Tumour Biology“), Weil der Stadt.*

Ole Pless and Achim Leutz. Identification of C/EBP $\beta$  interacting proteins. *Poster presentation at the MDC PhD Symposium 2004, MDC, Berlin.*

Berlin, 13. August 2007

## Quellenverzeichnis

- Abdel-Hafiz, H., Takimoto, G. S., Tung, L. and Horwitz, K. B. (2002). "The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression." *J Biol Chem* **277**(37): 33950-6.
- Ansieau, S., Strobl, L. J. and Leutz, A. (2001). "Activation of the Notch-regulated transcription factor CBF1/RBP-Jkappa through the 13SE1A oncoprotein." *Genes Dev* **15**(4): 380-5.
- Arora, T., Liu, B., He, H., Kim, J., Murphy, T. L., Murphy, K. M., Modlin, R. L. and Shuai, K. (2003). "PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4." *J Biol Chem* **278**(24): 21327-30.
- Ausubel, F., Brent, R. and Kingston, R. (2005). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Bailey, A. M. and Posakony, J. W. (1995). "Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity." *Genes Dev* **9**(21): 2609-22.
- Bayer, P., Arndt, A., Metzger, S., Mahajan, R., Melchior, F., Jaenicke, R. and Becker, J. (1998). "Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1." *J Mol Biol* **280**(2): 275-86.
- Bellavia, D., Campese, A. F., Alesse, E., Vacca, A., Felli, M. P., Balestri, A., Stoppacciaro, A., Tiveron, C., Tatangelo, L., Giovarelli, M., Gaetano, C., Ruco, L., Hoffman, E. S., Hayday, A. C., Lendahl, U., Frati, L., Gulino, A. and Screpanti, I. (2000). "Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice." *Embo J* **19**(13): 3337-48.
- Berberich-Siebelt, F., Berberich, I., Andrusis, M., Santner-Nanan, B., Jha, M. K., Klein-Hessling, S., Schimpl, A. and Serfling, E. (2006). "SUMOylation interferes with CCAAT/enhancer-binding protein beta-mediated c-myc repression, but not IL-4 activation in T cells." *J Immunol* **176**(8): 4843-51.
- Bernier-Villamor, V., Sampson, D. A., Matunis, M. J. and Lima, C. D. (2002). "Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1." *Cell* **108**(3): 345-56.
- Best, J. L., Ganiatsas, S., Agarwal, S., Changou, A., Salomoni, P., Shirihai, O., Meluh, P. B., Pandolfi, P. P. and Zon, L. I. (2002). "SUMO-1 protease-1 regulates gene transcription through PML." *Mol Cell* **10**(4): 843-55.
- Betz, A., Lampen, N., Martinek, S., Young, M. W. and Darnell, J. E., Jr. (2001). "A Drosophila PIAS homologue negatively regulates stat92E." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(17): 9563-8.
- Bies, J., Markus, J. and Wolff, L. (2002). "Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity." *J Biol Chem* **277**(11): 8999-9009.
- Bischof, O., Schwamborn, K., Martin, N., Werner, A., Sustmann, C., Grosschedl, R. and Dejean, A. (2006). "The E3 SUMO ligase PIASy is a regulator of cellular senescence and apoptosis." *Mol Cell* **22**(6): 783-94.
- Braun, H., Koop, R., Ertmer, A., Nacht, S. and Suske, G. (2001). "Transcription factor Sp3 is regulated by acetylation." *Nucleic Acids Res* **29**(24): 4994-5000.
- Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C. and Darnell, J. E., Jr. (1999). "Stat3 as an oncogene." *Cell* **98**(3): 295-303.
- Buck, M., Poli, V., van der Geer, P., Chojkier, M. and Hunter, T. (1999). "Phosphorylation of rat serine 105 or mouse threonine 217 in C/EBP beta is required for hepatocyte proliferation induced by TGF alpha." *Mol Cell* **4**(6): 1087-92.
- Bussow, K., Cahill, D., Niefeld, W., Bancroft, D., Scherzinger, E., Lehrach, H. and Walter, G. (1998). "A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library." *Nucleic Acids Res* **26**(21): 5007-8.
- Calkhoven, C. F., Muller, C. and Leutz, A. (2000). "Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression." *Genes Dev* **14**(15): 1920-32.
- Cao, Z., Umek, R. M. and McKnight, S. L. (1991). "Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells." *Genes Dev* **5**(9): 1538-52.



- Cesena, T. I., Cardinaux, J. R., Kwok, R. and Schwartz, J. (2007). "CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) beta is acetylated at multiple lysines: acetylation of C/EBPbeta at lysine 39 modulates its ability to activate transcription." *J Biol Chem* **282**(2): 956-67.
- Chang, C. J., Chen, Y. L. and Lee, S. C. (1998). "Coactivator TIF1beta interacts with transcription factor C/EBPbeta and glucocorticoid receptor to induce alpha1-acid glycoprotein gene expression." *Mol Cell Biol* **18**(10): 5880-7.
- Chen, G., Fernandez, J., Mische, S. and Courey, A. J. (1999). "A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in Drosophila development." *Genes Dev* **13**(17): 2218-30.
- Chen, H., Chong, Y. and Liu, C. L. (2000). "Active intracellular domain of Notch enhances transcriptional activation of CCAAT/enhancer binding protein beta on a rat pregnancy-specific glycoprotein gene." *Biochemistry* **39**(7): 1675-82.
- Chen, J. D. and Evans, R. M. (1995). "A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors." *Nature* **377**(6548): 454-7.
- Chen, X., Liu, W., Ambrosino, C., Ruocco, M. R., Poli, V., Romani, L., Quinto, I., Barbieri, S., Holmes, K. L., Venuta, S. and Scala, G. (1997). "Impaired generation of bone marrow B lymphocytes in mice deficient in C/EBPbeta." *Blood* **90**(1): 156-64.
- Chin, H. G., Pradhan, M., Esteve, P. O., Patnaik, D., Evans, T. C., Jr. and Pradhan, S. (2005). "Sequence specificity and role of proximal amino acids of the histone H3 tail on catalysis of murine G9A lysine 9 histone H3 methyltransferase." *Biochemistry* **44**(39): 12998-3006.
- Chinery, R., Brockman, J. A., Dransfield, D. T. and Coffey, R. J. (1997). "Antioxidant-induced nuclear translocation of CCAAT/enhancer-binding protein beta. A critical role for protein kinase A-mediated phosphorylation of Ser299." *J Biol Chem* **272**(48): 30356-61.
- Chuikov, S., Kurash, J. K., Wilson, J. R., Xiao, B., Justin, N., Ivanov, G. S., McKinney, K., Tempst, P., Prives, C., Gamblin, S. J., Barlev, N. A. and Reinberg, D. (2004). "Regulation of p53 activity through lysine methylation." *Nature* **432**(7015): 353-60.
- Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P. and Shuai, K. (1997). "Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3." *Science* **278**(5344): 1803-5.
- Clark, M. D., Panopoulou, G. D., Cahill, D. J., Bussow, K. and Lehrach, H. (1999). "Construction and analysis of arrayed cDNA libraries." *Methods Enzymol* **303**: 205-33.
- Collins, R. E., Tachibana, M., Tamaru, H., Smith, K. M., Jia, D., Zhang, X., Selker, E. U., Shinkai, Y. and Cheng, X. (2005). "In vitro and in vivo analyses of a Phe/Tyr switch controlling product specificity of histone lysine methyltransferases." *J Biol Chem* **280**(7): 5563-70.
- Conlon, R. A., Reaume, A. G. and Rossant, J. (1995). "Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites." *Development* **121**(5): 1533-45.
- Cox, D. M., Du, M., Guo, X., Siu, K. W. and McDermott, J. C. (2002). "Tandem affinity purification of protein complexes from mammalian cells." *Biotechniques* **33**(2): 267-8, 270.
- Croniger, C., Trus, M., Lysek-Stupp, K., Cohen, H., Liu, Y., Darlington, G. J., Poli, V., Hanson, R. W. and Reshef, L. (1997). "Role of the isoforms of CCAAT/enhancer-binding protein in the initiation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription at birth." *J Biol Chem* **272**(42): 26306-12.
- Deng, J., Hua, K., Caveney, E. J., Takahashi, N. and Harp, J. B. (2006). "Protein inhibitor of activated STAT3 inhibits adipogenic gene expression." *Biochem Biophys Res Commun* **339**(3): 923-31.
- Descombes, P. and Schibler, U. (1991). "A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA." *Cell* **67**(3): 569-79.
- Desterro, J. M., Rodriguez, M. S. and Hay, R. T. (1998). "SUMO-1 modification of Ikappa-Balpha inhibits NF-kappaB activation." *Mol Cell* **2**(2): 233-9.
- Doyle, T. G., Wen, C. and Greenwald, I. (2000). "SEL-8, a nuclear protein required for LIN-12 and GLP-1 signaling in Caenorhabditis elegans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 7877-81.
- Doyon, Y. and Cote, J. (2004). "The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex." *Curr Opin Genet Dev* **14**(2): 147-54.
- Duval, D., Duval, G., Keding, C., Poch, O. and Boeuf, H. (2003). "The 'PINIT' motif, of a newly identified conserved domain of the PIAS protein family, is essential for nuclear retention of PIAS3L." *FEBS Lett* **554**(1-2): 111-8.

- Eaton, E. M. and Sealy, L. (2003). "Modification of CCAAT/enhancer-binding protein-beta by the small ubiquitin-like modifier (SUMO) family members, SUMO-2 and SUMO-3." *J Biol Chem* **278**(35): 33416-21.
- Ehebauer, M., Hayward, P. and Martinez-Arias, A. (2006). "Notch signaling pathway." *Sci STKE* **2006**(364): cm7.
- Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L., Reynolds, T. C., Smith, S. D. and Sklar, J. (1991). "TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms." *Cell* **66**(4): 649-61.
- Esteve, P. O., Chin, H. G., Smallwood, A., Feehery, G. R., Gangisetty, O., Karpf, A. R., Carey, M. F. and Pradhan, S. (2006). "Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication." *Genes Dev* **20**(22): 3089-103.
- Fischer, D. D., Cai, R., Bhatia, U., Asselbergs, F. A., Song, C., Terry, R., Trogani, N., Widmer, R., Atadja, P. and Cohen, D. (2002). "Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10." *J Biol Chem* **277**(8): 6656-66.
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S. A., Kim, Y., Allis, C. D. and Khorasanizadeh, S. (2003). "Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains." *Genes Dev* **17**(15): 1870-81.
- Fujii, C., Nakamoto, Y., Lu, P., Tsuneyama, K., Popivanova, B. K., Kaneko, S. and Mukaida, N. (2005). "Aberrant expression of serine/threonine kinase Pim-3 in hepatocellular carcinoma development and its role in the proliferation of human hepatoma cell lines." *Int J Cancer* **114**(2): 209-18.
- Garces, C., Ruiz-Hidalgo, M. J., Font de Mora, J., Park, C., Miele, L., Goldstein, J., Bonvini, E., Porras, A. and Laborda, J. (1997). "Notch-1 controls the expression of fatty acid-activated transcription factors and is required for adipogenesis." *J Biol Chem* **272**(47): 29729-34.
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M. A., Copley, R. R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. and Superti-Furga, G. (2002). "Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes." *Nature* **415**(6868): 141-7.
- Gill, G. (2003). "Post-translational modification by the small ubiquitin-related modifier SUMO has big effects on transcription factor activity." *Curr Opin Genet Dev* **13**(2): 108-13.
- Gill, G. (2004). "SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?" *Genes Dev* **18**(17): 2046-59.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D. and Hay, R. T. (2003). "P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification." *Mol Cell* **11**(4): 1043-54.
- Gluzman, Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." *Cell* **23**(1): 175-82.
- Goo, Y. H., Sohn, Y. C., Kim, D. H., Kim, S. W., Kang, M. J., Jung, D. J., Kwak, E., Barlev, N. A., Berger, S. L., Chow, V. T., Roeder, R. G., Azorsa, D. O., Meltzer, P. S., Suh, P. G., Song, E. J., Lee, K. J., Lee, Y. C. and Lee, J. W. (2003). "Activating signal integrator 2 belongs to a novel steady-state complex that contains a subset of trithorax group proteins." *Mol Cell Biol* **23**(1): 140-9.
- Goodson, M. L., Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M. J., Park-Sarge, O. K. and Sarge, K. D. (2001). "Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor." *J Biol Chem* **276**(21): 18513-8.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* **36**(1): 59-74.
- Gross, M., Liu, B., Tan, J., French, F. S., Carey, M. and Shuai, K. (2001). "Distinct effects of PIAS proteins on androgen-mediated gene activation in prostate cancer cells." *Oncogene* **20**(29): 3880-7.
- Gross, M., Yang, R., Top, I., Gasper, C. and Shuai, K. (2004). "PIASy-mediated repression of the androgen receptor is independent of sumoylation." *Oncogene* **23**(17): 3059-66.

- Guo, R. J., Suh, E. R. and Lynch, J. P. (2004). "The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer." *Cancer Biol Ther* **3**(7): 593-601.
- Han, H., Tanigaki, K., Yamamoto, N., Kuroda, K., Yoshimoto, M., Nakahata, T., Ikuta, K. and Honjo, T. (2002). "Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision." *Int Immunol* **14**(6): 637-45.
- Hanlon, M., Sturgill, T. W. and Sealy, L. (2001). "ERK2- and p90(Rsk2)-dependent pathways regulate the CCAAT/enhancer-binding protein-beta interaction with serum response factor." *J Biol Chem* **276**(42): 38449-56.
- Hari, K. L., Cook, K. R. and Karpen, G. H. (2001). "The Drosophila Su(var)2-10 locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family." *Genes Dev* **15**(11): 1334-48.
- Hata, K., Nishimura, R., Ueda, M., Ikeda, F., Matsubara, T., Ichida, F., Hisada, K., Nokubi, T., Yamaguchi, A. and Yoneda, T. (2005). "A CCAAT/enhancer binding protein beta isoform, liver-enriched inhibitory protein, regulates commitment of osteoblasts and adipocytes." *Mol Cell Biol* **25**(5): 1971-9.
- Hay, R. T. (2005). "SUMO: a history of modification." *Mol Cell* **18**(1): 1-12.
- Hess, J. L. (2004). "Mechanisms of transformation by MLL." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **14**(4): 235-54.
- Hietakangas, V., Ahlskog, J. K., Jakobsson, A. M., Hellesuo, M., Sahlberg, N. M., Holmberg, C. I., Mikhailov, A., Palvimo, J. J., Pirkkala, L. and Sistonen, L. (2003). "Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1." *Mol Cell Biol* **23**(8): 2953-68.
- Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M. J., Mayhew, C. N., Goodson, M. L., Park-Sarge, O. K. and Sarge, K. D. (2001). "Regulation of heat shock transcription factor 1 by stress-induced SUMO-1 modification." *J Biol Chem* **276**(43): 40263-7.
- Huq, M. M., Tsai, N. P., Khan, S. A. and Wei, L. N. (2007). "Lysine trimethylation of retinoic acid receptor- $\alpha$  (RAR $\alpha$ ): A novel means to regulate receptor function." *Mol Cell Proteomics*.
- Ihara, M., Yamamoto, H. and Kikuchi, A. (2005). "SUMO-1 modification of PIASy, an E3 ligase, is necessary for PIASy-dependent activation of Tcf-4." *Mol Cell Biol* **25**(9): 3506-18.
- Iso, T., Kedes, L. and Hamamori, Y. (2003). "HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway." *J Cell Physiol* **194**(3): 237-55.
- Johnson, E. S. (2004). "Protein modification by SUMO." *Annu Rev Biochem* **73**: 355-82.
- Johnson, E. S. and Gupta, A. A. (2001). "An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins." *Cell* **106**(6): 735-44.
- Joo, M., Park, G. Y., Wright, J. G., Blackwell, T. S., Atchison, M. L. and Christman, J. W. (2004). "Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in macrophages by PU.1." *J Biol Chem* **279**(8): 6658-65.
- Jove, R. (2000). "Preface: STAT signaling." *Oncogene* **19**(21): 2466-7.
- Kagey, M. H., Melhuish, T. A. and Wotton, D. (2003). "The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3." *Cell* **113**(1): 127-37.
- Kahyo, T., Nishida, T. and Yasuda, H. (2001). "Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53." *Mol Cell* **8**(3): 713-8.
- Kao, H. Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C. R., Evans, R. M. and Kadesch, T. (1998). "A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway." *Genes Dev* **12**(15): 2269-77.
- Kenner, L., Hoebertz, A., Beil, T., Keon, N., Karreth, F., Eferl, R., Scheuch, H., Szremska, A., Amling, M., Schorpp-Kistner, M., Angel, P. and Wagner, E. F. (2004). "Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects." *J Cell Biol* **164**(4): 613-23.
- Ki, S. H., Cho, I. J., Choi, D. W. and Kim, S. G. (2005). "Glucocorticoid receptor (GR)-associated SMRT binding to C/EBP $\beta$  TAD and Nrf2 Neh4/5: role of SMRT recruited to GR in GSTA2 gene repression." *Mol Cell Biol* **25**(10): 4150-65.
- Kim, J., Cantwell, C. A., Johnson, P. F., Pfarr, C. M. and Williams, S. C. (2002). "Transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding proteins is controlled by a conserved inhibitory domain that is a target for sumoylation." *J Biol Chem* **277**(41): 38037-44.
- Kim, K. C., Geng, L. and Huang, S. (2003). "Inactivation of a histone methyltransferase by mutations in human cancers." *Cancer Res* **63**(22): 7619-23.

- Kitagawa, M., Oyama, T., Kawashima, T., Yedvobnick, B., Kumar, A., Matsuno, K. and Hari-gaya, K. (2001). "A human protein with sequence similarity to Drosophila mastermind coordinates the nuclear form of notch and a CSL protein to build a transcriptional ac-tivator complex on target promoters." *Mol Cell Biol* **21**(13): 4337-46.
- Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O. A. and Palvimo, J. J. (2002). "PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases." *Mol Cell Biol* **22**(14): 5222-34.
- Kouskouti, A., Scheer, E., Staub, A., Tora, L. and Talianidis, I. (2004). "Gene-specific modu-lation of TAF10 function by SET9-mediated methylation." *Mol Cell* **14**(2): 175-82.
- Kowenz-Leutz, E. and Leutz, A. (1999). "A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes." *Mol Cell* **4**(5): 735-43.
- Kowenz-Leutz, E., Twamley, G., Ansieau, S. and Leutz, A. (1994). "Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: activation through derepression." *Genes Dev* **8**(22): 2781-91.
- Kurooka, H. and Honjo, T. (2000). "Functional interaction between the mouse notch1 intra-cellular region and histone acetyltransferases PCAF and GCN5." *J Biol Chem* **275**(22): 17211-20.
- Kurooka, H., Kuroda, K. and Honjo, T. (1998). "Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse notch1 intracellular region." *Nucleic Acids Res* **26**(23): 5448-55.
- Lachner, M., O'Sullivan, R. J. and Jenuwein, T. (2003). "An epigenetic road map for histone lysine methylation." *J Cell Sci* **116**(Pt 11): 2117-24.
- Lai, E. C. (2002). "Keeping a good pathway down: transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins." *EMBO Rep* **3**(9): 840-5.
- Laiosa, C. V., Stadtfeld, M., Xie, H., de Andres-Aguayo, L. and Graf, T. (2006). "Reprogram-ming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors." *Immunity* **25**(5): 731-44.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F. and McKnight, S. L. (1989). "The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite." *Science* **243**(4899): 1681-8.
- Levine, S. S., Weiss, A., Erdjument-Bromage, H., Shao, Z., Tempst, P. and Kingston, R. E. (2002). "The core of the polycomb repressive complex is compositionally and function-ally conserved in flies and humans." *Mol Cell Biol* **22**(17): 6070-8.
- Lewis, P. W., Beall, E. L., Fleischer, T. C., Georlette, D., Link, A. J. and Botchan, M. R. (2004). "Identification of a Drosophila Myb-E2F2/RBF transcriptional repressor complex." *Genes Dev* **18**(23): 2929-40.
- Lin, D., Tatham, M. H., Yu, B., Kim, S., Hay, R. T. and Chen, Y. (2002). "Identification of a substrate recognition site on Ubc9." *J Biol Chem* **277**(24): 21740-8.
- Liu, B., Gross, M., ten Hoeve, J. and Shuai, K. (2001). "A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6): 3203-7.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D. and Shuai, K. (1998). "Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18): 10626-31.
- Liu, B., Mink, S., Wong, K. A., Stein, N., Getman, C., Dempsey, P. W., Wu, H. and Shuai, K. (2004). "PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in in-nate immunity." *Nat Immunol* **5**(9): 891-8.
- Liu, B., Yang, R., Wong, K. A., Getman, C., Stein, N., Teitell, M. A., Cheng, G., Wu, H. and Shuai, K. (2005). "Negative regulation of NF-kappaB signaling by PIAS1." *Mol Cell Biol* **25**(3): 1113-23.
- Long, J., Matsuura, I., He, D., Wang, G., Shuai, K. and Liu, F. (2003). "Repression of Smad transcriptional activity by PIASy, an inhibitor of activated STAT." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(17): 9791-6.
- Long, J., Wang, G., Matsuura, I., He, D. and Liu, F. (2004). "Activation of Smad transcriptional activity by protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(1): 99-104.
- Lozano, G. and Zambetti, G. P. (2005). "Gankyrin: an intriguing name for a novel regulator of p53 and RB." *Cancer Cell* **8**(1): 3-4.
- Lozzio, C. B. and Lozzio, B. B. (1975). "Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome." *Blood* **45**(3): 321-34.
- Lyst, M. J., Nan, X. and Stancheva, I. (2006). "Regulation of MBD1-mediated transcriptional repression by SUMO and PIAS proteins." *Embo J* **25**(22): 5317-28.

- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. and Melchior, F. (1997). "A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2." *Cell* **88**(1): 97-107.
- Mahajan, R., Gerace, L. and Melchior, F. (1998). "Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association." *J Cell Biol* **140**(2): 259-70.
- Mahlknecht, U., Ottmann, O. G. and Hoelzer, D. (2001). "Far-Western based protein-protein interaction screening of high-density protein filter arrays." *J Biotechnol* **88**(2): 89-94.
- Martinez Arias, A., Zecchini, V. and Brennan, K. (2002). "CSL-independent Notch signalling: a checkpoint in cell fate decisions during development?" *Curr Opin Genet Dev* **12**(5): 524-33.
- Matunis, M. J., Wu, J. and Blobel, G. (1998). "SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex." *J Cell Biol* **140**(3): 499-509.
- Megidish, T., Xu, J. H. and Xu, C. W. (2002). "Activation of p53 by protein inhibitor of activated Stat1 (PIAS1)." *J Biol Chem* **277**(10): 8255-9.
- Mencia, M. and de Lorenzo, V. (2004). "Functional transplantation of the sumoylation machinery into Escherichia coli." *Protein Expr Purif* **37**(2): 409-18.
- Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Muller, J. M., Schneider, R., Peters, A. H., Gunther, T., Buettner, R. and Schule, R. (2005). "LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription." *Nature* **437**(7057): 436-9.
- Mikkola, H. K., Klintman, J., Yang, H., Hock, H., Schlaeger, T. M., Fujiwara, Y. and Orkin, S. H. (2003). "Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene." *Nature* **421**(6922): 547-51.
- Min, J., Zhang, Y. and Xu, R. M. (2003). "Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27." *Genes Dev* **17**(15): 1823-8.
- Mink, S., Haenig, B. and Klempnauer, K. H. (1997). "Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta." *Mol Cell Biol* **17**(11): 6609-17.
- Mo, X., Kowenz-Leutz, E., Xu, H. and Leutz, A. (2004). "Ras induces mediator complex exchange on C/EBP beta." *Mol Cell* **13**(2): 241-50.
- Moscovici, C., Moscovici, M. G., Jimenez, H., Lai, M. M., Hayman, M. J. and Vogt, P. K. (1977). "Continuous tissue culture cell lines derived from chemically induced tumors of Japanese quail." *Cell* **11**(1): 95-103.
- Nacerddine, K., Lehembre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Pandolfi, P. P. and Dejean, A. (2005). "The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice." *Dev Cell* **9**(6): 769-79.
- Nakagawa, K. and Yokosawa, H. (2002). "PIAS3 induces SUMO-1 modification and transcriptional repression of IRF-1." *FEBS Lett* **530**(1-3): 204-8.
- Nakajima, T., Kinoshita, S., Sasagawa, T., Sasaki, K., Naruto, M., Kishimoto, T. and Akira, S. (1993). "Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(6): 2207-11.
- Nicolas, M., Wolfer, A., Raj, K., Kummer, J. A., Mill, P., van Noort, M., Hui, C. C., Clevers, H., Dotto, G. P. and Radtke, F. (2003). "Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin." *Nat Genet* **33**(3): 416-21.
- Nishimura, M., Isaka, F., Ishibashi, M., Tomita, K., Tsuda, H., Nakanishi, S. and Kageyama, R. (1998). "Structure, chromosomal locus, and promoter of mouse Hes2 gene, a homologue of Drosophila hairy and Enhancer of split." *Genomics* **49**(1): 69-75.
- Nishio, H. and Walsh, M. J. (2004). "CCAAT displacement protein/cut homolog recruits G9a histone lysine methyltransferase to repress transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(31): 11257-62.
- Oelgeschlager, M., Janknecht, R., Krieg, J., Schreek, S. and Luscher, B. (1996). "Interaction of the co-activator CBP with Myb proteins: effects on Myb-specific transactivation and on the cooperativity with NF-M." *Embo J* **15**(11): 2771-80.
- Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D. M. and Nakatani, Y. (2002). "A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells." *Science* **296**(5570): 1132-6.
- Okubo, S., Hara, F., Tsuchida, Y., Shimotakahara, S., Suzuki, S., Hatanaka, H., Yokoyama, S., Tanaka, H., Yasuda, H. and Shindo, H. (2004). "NMR structure of the N-terminal

- domain of SUMO ligase PIAS1 and its interaction with tumor suppressor p53 and A/T-rich DNA oligomers." *J Biol Chem* **279**(30): 31455-61.
- Okuyama, R., Nguyen, B. C., Talora, C., Ogawa, E., Tommasi di Vignano, A., Lioumi, M., Chiorino, G., Tagami, H., Woo, M. and Dotto, G. P. (2004). "High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism." *Dev Cell* **6**(4): 551-62.
- Orkin, S. H. and Zon, L. I. (2002). "Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity." *Nat Immunol* **3**(4): 323-8.
- Patnaik, D., Chin, H. G., Esteve, P. O., Benner, J., Jacobsen, S. E. and Pradhan, S. (2004). "Substrate specificity and kinetic mechanism of mammalian G9a histone H3 methyltransferase." *J Biol Chem* **279**(51): 53248-58.
- Pear, W. S. and Aster, J. C. (2004). "T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma: a human cancer commonly associated with aberrant NOTCH1 signaling." *Curr Opin Hematol* **11**(6): 426-33.
- Pear, W. S., Aster, J. C., Scott, M. L., Hasserjian, R. P., Soffer, B., Sklar, J. and Baltimore, D. (1996). "Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles." *J Exp Med* **183**(5): 2283-91.
- Petcherski, A. G. and Kimble, J. (2000). "LAG-3 is a putative transcriptional activator in the *C. elegans* Notch pathway." *Nature* **405**(6784): 364-8.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A. and Melchior, F. (2002). "The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity." *Cell* **108**(1): 109-20.
- Piwien-Pilipuk, G., Van Mater, D., Ross, S. E., MacDougald, O. A. and Schwartz, J. (2001). "Growth hormone regulates phosphorylation and function of CCAAT/enhancer-binding protein beta by modulating Akt and glycogen synthase kinase-3." *J Biol Chem* **276**(22): 19664-71.
- Poukka, H., Karvonen, U., Janne, O. A. and Palvimo, J. J. (2000). "Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14145-50.
- Pouyssegur, J., Dayan, F. and Mazure, N. M. (2006). "Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression." *Nature* **441**(7092): 437-43.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Seraphin, B. (2001). "The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification." *Methods* **24**(3): 218-29.
- Radtke, F., Wilson, A. and MacDonald, H. R. (2004). "Notch signaling in T- and B-cell development." *Curr Opin Immunol* **16**(2): 174-9.
- Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R. and Aguet, M. (1999). "Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1." *Immunity* **10**(5): 547-58.
- Ramji, D. P. and Foka, P. (2002). "CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation." *Biochem J* **365**(Pt 3): 561-75.
- Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., Aster, J. C., Krishna, S., Metzger, D., Chambon, P., Miele, L., Aguet, M., Radtke, F. and Dotto, G. P. (2001). "Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation." *Embo J* **20**(13): 3427-36.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D. and Jenuwein, T. (2000). "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases." *Nature* **406**(6796): 593-9.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Seraphin, B. (1999). "A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration." *Nat Biotechnol* **17**(10): 1030-2.
- Ringrose, L. and Paro, R. (2004). "Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins." *Annu Rev Genet* **38**: 413-43.
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P. and Hay, R. T. (1999). "SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53." *Embo J* **18**(22): 6455-61.
- Rooney, J. W. and Calame, K. L. (2001). "TIF1beta functions as a coactivator for C/EBPbeta and is required for induced differentiation in the myelomonocytic cell line U937." *Genes Dev* **15**(22): 3023-38.

- Ross, D. A., Hannehalli, S., Tobias, J. W., Cooch, N., Shiekhatar, R. and Kadesch, T. (2006). "Functional analysis of Hes-1 in preadipocytes." *Mol Endocrinol* **20**(3): 698-705.
- Ross, D. A., Rao, P. K. and Kadesch, T. (2004). "Dual roles for the Notch target gene Hes-1 in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes." *Mol Cell Biol* **24**(8): 3505-13.
- Ross, S., Best, J. L., Zon, L. I. and Gill, G. (2002). "SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization." *Mol Cell* **10**(4): 831-42.
- Roth, W., Sustmann, C., Kieslinger, M., Gilmozzi, A., Irmer, D., Kremmer, E., Turck, C. and Grosschedl, R. (2004). "PIASy-deficient mice display modest defects in IFN and Wnt signaling." *J Immunol* **173**(10): 6189-99.
- Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F. and Grosschedl, R. (2001). "PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies." *Genes Dev* **15**(23): 3088-103.
- Sakamoto, Y., Watanabe, S., Ichimura, T., Kawasuji, M., Koseki, H., Baba, H. and Nakao, M. (2007). "Overlapping roles of the methylated DNA-binding protein MBD1 and polycomb group proteins in transcriptional repression of HOXA genes and heterochromatin foci formation." *J Biol Chem* **282**(22): 16391-400.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.
- Santti, H., Mikkonen, L., Anand, A., Hirvonen-Santti, S., Toppari, J., Panhuysen, M., Vauti, F., Perera, M., Corte, G., Wurst, W., Janne, O. A. and Palvimo, J. J. (2005). "Disruption of the murine PIASx gene results in reduced testis weight." *J Mol Endocrinol* **34**(3): 645-54.
- Sapetschnig, A., Rischitor, G., Braun, H., Doll, A., Schergaut, M., Melchior, F. and Suske, G. (2002). "Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1." *Embo J* **21**(19): 5206-15.
- Schneider, U., Schwenk, H. U. and Bornkamm, G. (1977). "Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma." *Int J Cancer* **19**(5): 621-6.
- Schwartz, Y. B., Kahn, T. G., Nix, D. A., Li, X. Y., Bourgon, R., Biggin, M. and Pirrotta, V. (2006). "Genome-wide analysis of Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*." *Nat Genet* **38**(6): 700-5.
- Screpanti, I., Romani, L., Musiani, P., Modesti, A., Fattori, E., Lazzaro, D., Sellitto, C., Scarpa, S., Bellavia, D., Lattanzio, G. and et al. (1995). "Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice." *Embo J* **14**(9): 1932-41.
- Semenza, G. L. (2001). "HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus." *Cell* **107**(1): 1-3.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." *Anal Chem* **68**(5): 850-8.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J. R., Cole, P. A. and Casero, R. A. (2004). "Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1." *Cell* **119**(7): 941-53.
- Shi, Y., Sawada, J., Sui, G., Affar el, B., Whetstone, J. R., Lan, F., Ogawa, H., Luke, M. P. and Nakatani, Y. (2003). "Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex." *Nature* **422**(6933): 735-8.
- Shuai, K. and Liu, B. (2005). "Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system." *Nat Rev Immunol* **5**(8): 593-605.
- Shuman, J. D., Sebastian, T., Kaldis, P., Copeland, T. D., Zhu, S., Smart, R. C. and Johnson, P. F. (2004). "Cell cycle-dependent phosphorylation of C/EBPbeta mediates oncogenic cooperativity between C/EBPbeta and H-RasV12." *Mol Cell Biol* **24**(17): 7380-91.
- Song, J., Durrin, L. K., Wilkinson, T. A., Krontiris, T. G. and Chen, Y. (2004). "Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(40): 14373-8.
- Staloch, L. J., Divine, J. K., Witten, J. T. and Simon, T. C. (2005). "C/EBP and Cdx family factors regulate liver fatty acid binding protein transgene expression in the small intestinal epithelium." *Biochim Biophys Acta* **1731**(3): 168-78.
- Stauffer, D. R., Howard, T. L., Nyun, T. and Hollenberg, S. M. (2001). "CHMP1 is a novel nuclear matrix protein affecting chromatin structure and cell-cycle progression." *J Cell Sci* **114**(Pt 13): 2383-93.

- Steinacher, R. and Schar, P. (2005). "Functionality of human thymine DNA glycosylase requires SUMO-regulated changes in protein conformation." *Curr Biol* **15**(7): 616-23.
- Sterneck, E., Blattner, C., Graf, T. and Leutz, A. (1992a). "Structure of the chicken myelomonocytic growth factor gene and specific activation of its promoter in avian myelomonocytic cells by protein kinases." *Mol Cell Biol* **12**(4): 1728-35.
- Sterneck, E., Muller, C., Katz, S. and Leutz, A. (1992b). "Autocrine growth induced by kinase type oncogenes in myeloid cells requires AP-1 and NF-M, a myeloid specific, C/EBP-like factor." *Embo J* **11**(1): 115-26.
- Sterneck, E., Tessarollo, L. and Johnson, P. F. (1997). "An essential role for C/EBPbeta in female reproduction." *Genes Dev* **11**(17): 2153-62.
- Sternsdorf, T., Jensen, K., Reich, B. and Will, H. (1999). "The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers." *J Biol Chem* **274**(18): 12555-66.
- Sternsdorf, T., Jensen, K. and Will, H. (1997). "Evidence for covalent modification of the nuclear dot-associated proteins PML and Sp100 by PIC1/SUMO-1." *J Cell Biol* **139**(7): 1621-34.
- Subramanian, L., Benson, M. D. and Iniguez-Lluhi, J. A. (2003). "A synergy control motif within the attenuator domain of CCAAT/enhancer-binding protein alpha inhibits transcriptional synergy through its PIASy-enhanced modification by SUMO-1 or SUMO-3." *J Biol Chem* **278**(11): 9134-41.
- Swiatek, P. J., Lindsell, C. E., del Amo, F. F., Weinmaster, G. and Gridley, T. (1994). "Notch1 is essential for postimplantation development in mice." *Genes Dev* **8**(6): 707-19.
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Fukushima, T. and Shinkai, Y. (2001). "Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3." *J Biol Chem* **276**(27): 25309-17.
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., Kato, H. and Shinkai, Y. (2002). "G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis." *Genes Dev* **16**(14): 1779-91.
- Taghon, T., Thys, K., De Smedt, M., Weerkamp, F., Staal, F. J., Plum, J. and Leclercq, G. (2003). "Homeobox gene expression profile in human hematopoietic multipotent stem cells and T-cell progenitors: implications for human T-cell development." *Leukemia* **17**(6): 1157-63.
- Tahirov, T. H., Sato, K., Ichikawa-Iwata, E., Sasaki, M., Inoue-Bungo, T., Shiina, M., Kimura, K., Takata, S., Fujikawa, A., Morii, H., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Ishii, S. and Ogata, K. (2002). "Mechanism of c-Myb-C/EBP beta cooperation from separated sites on a promoter." *Cell* **108**(1): 57-70.
- Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T. and Honjo, T. (1995). "Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H)." *Curr Biol* **5**(12): 1416-23.
- Tanaka, T., Akira, S., Yoshida, K., Umemoto, M., Yoneda, Y., Shirafuji, N., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N. and Kishimoto, T. (1995). "Targeted disruption of the NF-IL6 gene discloses its essential role in bacteria killing and tumor cytotoxicity by macrophages." *Cell* **80**(2): 353-61.
- Tian, S., Poukka, H., Palvimo, J. J. and Janne, O. A. (2002). "Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor." *Biochem J* **367**(Pt 3): 907-11.
- Trautwein, C., Caelles, C., van der Geer, P., Hunter, T., Karin, M. and Chojkier, M. (1993). "Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain." *Nature* **364**(6437): 544-7.
- Trautwein, C., van der Geer, P., Karin, M., Hunter, T. and Chojkier, M. (1994). "Protein kinase A and C site-specific phosphorylations of LAP (NF-IL6) modulate its binding affinity to DNA recognition elements." *J Clin Invest* **93**(6): 2554-61.
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P. and Zhang, Y. (2006). "Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins." *Nature* **439**(7078): 811-6.
- Tussie-Luna, M. I., Bayarsaihan, D., Seto, E., Ruddle, F. H. and Roy, A. L. (2002). "Physical and functional interactions of histone deacetylase 3 with TFII-I family proteins and PIASxbeta." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20): 12807-12.



- Wang, H., An, W., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Chatton, B., Tempst, P., Roeder, R. G. and Zhang, Y. (2003). "mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression." *Mol Cell* **12**(2): 475-87.
- Wang, W. and Malcolm, B. A. (1999). "Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis." *Biotechniques* **26**(4): 680-2.
- Wegner, M., Cao, Z. and Rosenfeld, M. G. (1992). "Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP beta." *Science* **256**(5055): 370-3.
- Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P. t., Silverman, L. B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S. C., Look, A. T. and Aster, J. C. (2004). "Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia." *Science* **306**(5694): 269-71.
- Wong, K. A., Kim, R., Christofk, H., Gao, J., Lawson, G. and Wu, H. (2004). "Protein inhibitor of activated STAT Y (PIASy) and a splice variant lacking exon 6 enhance sumoylation but are not essential for embryogenesis and adult life." *Mol Cell Biol* **24**(12): 5577-86.
- Wu, L., Aster, J. C., Blacklow, S. C., Lake, R., Artavanis-Tsakonas, S. and Griffin, J. D. (2000). "MAML1, a human homologue of Drosophila mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors." *Nat Genet* **26**(4): 484-9.
- Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T. A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A. L., Roeder, R. G., Brivanlou, A. H. and Allis, C. D. (2005). "WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development." *Cell* **121**(6): 859-72.
- Xu, M., Nie, L., Kim, S. H. and Sun, X. H. (2003). "STAT5-induced Id-1 transcription involves recruitment of HDAC1 and deacetylation of C/EBPbeta." *Embo J* **22**(4): 893-904.
- Yamamoto, H., Ihara, M., Matsuura, Y. and Kikuchi, A. (2003). "Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4." *Embo J* **22**(9): 2047-59.
- Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. and Zhang, Y. (2006). "JHDM2A, a JmJc-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor." *Cell* **125**(3): 483-95.
- Yang, S. H., Jaffray, E., Hay, R. T. and Sharrocks, A. D. (2003). "Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity." *Mol Cell* **12**(1): 63-74.
- Yang, S. H. and Sharrocks, A. D. (2004). "SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression." *Mol Cell* **13**(4): 611-7.
- Yang, Y., Lorick, K. L., Jensen, J. P. and Weissman, A. M. (2005). "Expression and evaluation of RING finger proteins." *Methods Enzymol* **398**: 103-12.
- Young, R. A. and Davis, R. W. (1983). "Efficient isolation of genes by using antibody probes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(5): 1194-8.
- Zhang, X., Yang, Z., Khan, S. I., Horton, J. R., Tamaru, H., Selker, E. U. and Cheng, X. (2003). "Structural basis for the product specificity of histone lysine methyltransferases." *Mol Cell* **12**(1): 177-85.
- Zhang, Y. and Reinberg, D. (2001). "Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails." *Genes Dev* **15**(18): 2343-60.
- Zhong, S., Salomoni, P. and Pandolfi, P. P. (2000). "The transcriptional role of PML and the nuclear body." *Nat Cell Biol* **2**(5): E85-90.